

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra fyziologie živočichů**

## **Analýza mozkomíšního moku u pacientů s hydrocefalem**

**The analysis of cerebrospinal fluid in patients with hydrocephalus**

**Bc. Tereza Chlupáčová**



**Diplomová práce**

**Praha, 2016**

:

**Školitel: PharmDr. Lucie Kolátorová, Ph.D.**

Tato diplomová práce vznikla v rámci studie podpořené Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví ČR (Hormonální ukazatele jako prediktory vývoje mentálních změn u pacientů s hydrocefalem – NT 12349-4).

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením své školitelky PharmDr. Lucie Kolátorové, Ph.D. v Endokrinologickém ústavu v Praze s použitím uvedených literárních pramenů.

V Praze dne.....

.....

podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce PharmDr. Lucii Kolátorové, Ph.D. za pomoc, podporu, trpělivost a odborné rady při vypracovávání mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala kolegům z Oddělení steroidů a proteofaktorů z EÚ v Praze za oporu a pomoc při laboratorní práci. V neposlední řadě děkuji své rodině za výdrž, domácí zázemí a neuvěřitelnou podporu při studiu.

## ABSTRAKT

Normotenzní hydrocefalus (NPH) je neurodegenerativní onemocnění, které postihuje převážně starší věkové skupiny. Dochází při něm k hromadění mozkomíšního moku (CSF), což vede ke zvětšení mozkových komor a následnému utlačování mozkových struktur. Klinické projevy (poruchy chůze, rozvoj demence, inkontinence) mohou být snadno zaměněny s projevy jiných neurodegenerativních onemocnění. Na rozdíl od dalších onemocnění tohoto typu, lze NPH operativně léčit, pokud je včas rozpoznán. Pacienti jsou k operaci indikováni na základě lumbálního drenážního testu. V současné době nejsou známy spolehlivé laboratorní biomarkery, o které by se mohla diagnostika NPH opřít. V minulosti se u neurodegenerativních onemocnění ukázaly být steroidy spřažené s neuronální aktivitou vhodnými diagnostickými markery. V rámci diplomové práce byla vyvinuta instrumentální metoda, kterou byly u pacientů s NPH a zdravého kontrolního souboru změřeny hladiny vybraných steroidů v CSF. Významný rozdíl byl zjištěn v koncentracích aldosteronu a kortizonu. Aldosteron byl vyšší u skupiny s NPH a kortizon u kontrol. V rámci diagnostiky je důležité rozlišit pacienty s NPH a pacienty, kteří mají podobné klinické příznaky. Spektrum stanovovaných analytů bylo rozšířeno o další steroidy, jejichž hladiny byly měřeny u obou zmíněných skupin pacientů. Koncentrace se lišily pouze u sulfátu dehydroepiandrosteronu, nižší hodnoty byly zjištěny u NPH. Výsledky práce naznačují roli steroidních hormonů při laboratorní diagnostice a následné kontrole celkového stavu pacientů s NPH.

Klíčová slova: hydrocefalus, mozkomíšní mok, steroidní hormony, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

## **ABSTRACT**

Normotensive hydrocephalus (NPH) is a neurodegenerative disease that occurs mainly in patients of high age. The disorder causes accumulation of cerebrospinal fluid (CSF), which leads to enlargement of ventricles and pressure exerted on cerebral structures. Clinical manifestations (gait disorders, development of dementia, incontinence) can be easily confused with symptoms of other neurodegenerative diseases; unlike other such disorders, however, NPH can be treated by surgery, if diagnosed in time. Patients are indicated for the procedure by a lumbar drainage test. There are currently no reliable laboratory biomarkers known that could be the basis of NPH diagnostics. In the past, steroids proved to be linked to neuronal activity in neurodegenerative diseases with the help of specific diagnostic markers. An instrumental method has been developed for the purposes of this thesis and it was used to gauge the level of certain steroids in CSF in a sample group of NPH patients and a control sample group of healthy individuals. A significant difference has been found in levels of aldosterone and cortisone. Aldosterone was higher in NPH sufferers, while cortisone levels were higher in the control group. It is crucial to differentiate patients with NPH from patients with similar clinical manifestations during diagnostics (LDneg). The spectre of assessed analytes has therefore been expanded with other steroids and levels have been measured in both patient groups. The discovered concentrations only varied in dehydroepiandrosterone sulphate that was lower in NPH patients than in the LDneg group. The findings of the present thesis suggest a significant role of steroid hormones in laboratory diagnostics and following monitoring of NPH patients.

Key words: hydrocephalus, cerebrospinal fluid, steroid hormones, liquid chromatography, mass spectrometry

## OBSAH

1.	ÚVOD.....	1
2.	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	2
2.1	MOZKOMÍŠNÍ MOK .....	2
2.1.1	SLOŽENÍ A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI MOZKOMÍŠNÍHO MOKU .....	2
2.1.2	FYZIOLOGIE CSF A KOMOROVÝ SYSTÉM .....	3
2.1.3	HEMATOENCEFALICKÁ BARIÉRA .....	5
2.2	HYDROCEFALUS .....	7
2.2.1	HISTORIE .....	7
2.2.2	CHARAKTERISTIKA ONEMOCNĚNÍ .....	9
2.2.2.1	OBSTRUKČNÍ HYDROCEFALUS.....	9
2.2.2.2	KOMUNIKUJÍCÍ HYDROCEFALUS .....	9
2.2.2.3	NORMOTENZNÍ HYDROCEFALUS.....	9
2.2.3	KLINICKÉ PŘÍZNAKY NPH .....	10
2.2.4	DIAGNOSTIKA A LÉČBA NPH.....	11
2.2.4.1	LUMBÁLNÍ INFÚZNÍ TEST .....	11
2.2.4.2	LUMBÁLNÍ DRENÁŽNÍ TEST .....	12
2.2.4.3	OPERATIVNÍ LÉČBA .....	13
2.3	STEROIDNÍ HORMONY .....	14
2.3.1	ÚVOD.....	14
2.3.2	BIOSYNTÉZA .....	16
2.3.3	NEUROSTEROIDY .....	19
2.3.3.1	MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY NEUROSTEROIDŮ .....	20
2.4	METODY STANOVENÍ.....	23
2.4.1	IMUNOANALYTICKÉ METODY .....	23
2.4.1.1	RADIOIMUNOANALÝZA.....	24
2.4.2	CHROMATOGRAFICKÉ METODY .....	25
2.4.2.1	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	25

2.4.2.2	KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	26
2.4.2.3	KOMBINACE CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ.....	26
3.	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	29
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	30
4.1	ÚČASTNÍCI STUDIE .....	30
4.2	SBĚR VZORKŮ .....	30
4.3	CHEMIKÁLIE A REAGENCIE .....	31
4.4	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A SPOTŘEBNÍ MATERIÁL .....	31
4.5	MĚŘENÉ STEROIDY.....	33
4.6	PŘÍPRAVA VZORKŮ A REAGENCIÍ.....	33
4.6.1	PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ.....	33
4.6.2	PŘÍPRAVA 5mM AMONIUM FORMÁTU V 60% METHANOLU .....	34
4.6.3	PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO LCMS/MS ANALÝZU .....	34
4.6.4	PŘÍPRAVA PRO VALIDACI.....	35
4.6.5	PODMÍNKY PŘI MĚŘENÍ LCMS/MS.....	35
4.6.6	PŘÍPRAVA PRO RIA ANALÝZU.....	36
4.7	VÝVOJ METODIKY LCMS/MS.....	37
4.7.1	DERIVATIZACE .....	37
4.7.2	OPTIMALIZACE A VALIDACE.....	38
4.7.3	CHARAKTERISTIKY METODY.....	38
4.8	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT .....	40
5.	VÝSLEDKY .....	41
5.1	CÍL 1 - VÝVOJ METODIKY PRO STANOVENÍ VYBRANÝCH STEROIDNÍCH HORMONŮ V CSF.....	41
5.2	CÍL 2 – POROVNÁNÍ ZÁKLADNÍ PALETY NEUROAKTIVNÍCH A DALŠÍCH STEROIDŮ U PACIENTŮ S NPH A ZDRAVÉHO KONTROLNÍHO SOUBORU.....	41

5.3	CÍL 3 - ROZŠÍŘENÍ PALETY STANOVOVANÝCH STEROIDŮ A POROVNÁNÍ JEJICH HLADIN U PACIENTŮ S NPH A PACIENTŮ S LDneg.....	45
6.	DISKUZE .....	56
6.1	CÍL 1 – VÝVOJ METODIKY PRO STANOVENÍ VYBRANÝCH STEROIDNÍCH HORMONŮ V CSF .....	56
6.2	CÍL 2 – POROVNÁNÍ ZÁKLADNÍ PALETY NEUROAKTIVNÍCH A DALŠÍCH STEROIDŮ U PACIENTŮ S NPH A ZDRAVÉHO KONTROLNÍHO SOUBORU.....	56
6.3	CÍL 3 – ROZŠÍŘENÍ PALETY STANOVOVANÝCH STEROIDŮ A POROVNÁNÍ JEJICH HLADIN U PACIENTŮ S NPH A PACIENTŮ S LDneg .....	58
7.	ZÁVĚR .....	61
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	62
9.	PŘÍLOHA A .....	72



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>16<math>\alpha</math>-OH-DHEA</b>	16 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosteron
<b>7<math>\alpha</math>-OH-DHEA</b>	7 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosteron
<b>7<math>\beta</math>-OH DHEA</b>	7 $\beta$ -hydroxy-dehydroepiandrosteron
<b>Ab</b>	protilátka
<b>AD</b>	Alzheimerova demence
<b>Ag</b>	antigen
<b>APCI</b>	chemická ionizace za atmosférického tlaku
<b>BBB</b>	hematoencefalická bariéra ( <i>blood-brain barrier</i> )
<b>C</b>	kontrolní soubor
<b>CNS</b>	centrální nervová soustava
<b>CSF</b>	mozkomíšní mok ( <i>cerebrospinal fluid</i> )
<b>DHEA</b>	dehydroepiandrosteron
<b>DHEAS</b>	dehydroepiandrosteron sulfát
<b>ECD</b>	detekce vychytáváním elektronů ( <i>elektron capture detector</i> )
<b>ESI</b>	ionizace elektrosprejem
<b>EÚ</b>	Endokrinologický ústav
<b>FID</b>	plamenoionizační detektor ( <i>flame ionization detektor</i> )
<b>GABA</b>	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
<b>GABA<sub>A</sub></b>	receptory GABA typu A
<b>GC</b>	plynová chromatografie
<b>GCMS</b>	plynová chromatografie s hmotnostním detektorem ( <i>gas chromatography-mass spectrometry</i> )
<b>HSD</b>	hydroxysteroidní dehydrogenáza
<b>ICP</b>	nitrokomorový tlak
<b>IS</b>	interní standard
<b>LC</b>	kapalinová chromatografie

<b>LCMS</b>	kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem ( <i>liquid chromatography mass spectrometry</i> )
<b>LCMS/MS</b>	kapalinový chromatograf s tandemovým hmotnostním detektorem
<b>LDneg</b>	skupina pacientů s negativní reakcí na lumbální drenážní test
<b>LDT</b>	lumbální drenážní test
<b>LIT</b>	lumbální infúzní test
<b>LOD</b>	mez detekce ( <i>limit of detection</i> )
<b>LOQ</b>	mez stanovitelnosti ( <i>limit of quantification</i> )
<b>ME</b>	matricový efekt
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>NAS</b>	neuroaktivní steroidy
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartátový receptor
<b>NPH</b>	normotenzní hydrocefalus
<b>NS</b>	neurosteroidy
<b>OSP</b>	Oddělení steroidů a proteofaktorů
<b>RIA</b>	radioimunoanalýza ( <i>radioimmunoassay</i> )
<b>StAR</b>	steroidogenní akutní regulační protein
<b>TCD</b>	tepelně vodivostní detektor ( <i>thermal conductivity detektor</i> )
<b>TSPO</b>	translokační protein
<b>ÚVN</b>	Ústřední vojenská nemocnice v Praze
<b>UV-VIS</b>	spektrofotometrický detektor
<b>VPS</b>	ventrikulo-peritoneální shunt

## 1. ÚVOD

Normotenzní hydrocefalus (NPH) je jedním z nejvíce poddiagnostikovaných onemocnění dnešní doby. Příčinou vzniku NPH je nerovnováha mezi sekrecí a absorpcí mozkomíšního moku (CSF), kdy dochází k jeho hromadění a postupnému utlačování mozkového parenchymu. Pomocí operativní léčby je možné zvrátit vývoj degenerace a výrazně tak zlepšit stav pacienta. Diagnostika je vzhledem k nespecifickým klinickým příznakům NPH velice obtížná a proto je třeba zaměřit pozornost na hledání specifického biomarkeru, který by mohl pomoci při rozlišování NPH od jiných neurodegenerativních onemocnění. Pro reflexi neurologických dějů se analýza CSF ukázala jako vhodná metoda, která se uplatňuje při diagnostice a porozumění fyziologických změn v organismu a to díky jeho blízkému kontaktu s mozkovou tkání (Tarnaris et al. 2006). CSF v těle plní několik funkcí a to mechanickou ochranu, funkci hemostatickou a metabolickou. Během uplynulých let se v rámci výzkumů hledaly biologicky aktivní látky přítomné v CSF, které by mohly zpřesnit diagnostiku a zároveň zhodnotit odpověď na léčbu a další prognózu pacienta. Mezi látky zasluhující si v tomto smyslu pozornost patří jistě steroidní hormony. Jedná se o lipofilní látky, které mohou prostupovat hematoencefalickou bariérou a regulovat tak funkce nervové soustavy. Steroidy ovlivňující přímo neuronální excitabilitu se nazývají neuroaktivní steroidy a jejich podskupina syntetizovaná přímo v mozku *de novo* je známa jako neurosteroidy (NS). NS působí v organismu převážně na negenomové úrovni, kdy ovlivňují fyziologické pochody prostřednictvím receptorů – iontových kanálů. Tyto změny se projeví na rozdíl od klasických genomových účinků steroidů velmi rychle a to v řádech sekund až milisekund. Steroidy se v minulosti již několikrát prokázaly jako významné ukazatele, které lze využít jak v diagnostice, tak v léčbě neurodegenerativních onemocnění.

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na stanovení širšího spektra steroidů a neurosteroidů zapojujících se do fyziologických a patofyziologických dějů u neurodegenerativních onemocnění. Získané výsledky by tak mohly být základem zjednodušení diagnostiky NPH.

## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 MOZKOMÍŠNÍ MOK

#### 2.1.1 SLOŽENÍ A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI MOZKOMÍŠNÍHO MOKU

Mozkomíšní mok (CSF, likvor) je čirá, bezbarvá kapalina, která se řadí mezi transcelulární tekutiny. Co se týče rozvodu látek, má CSF totožné kvalitativní vlastnosti jako plazma, ovšem odlišné kvantitativní složení s nízkým obsahem bílkovin (v plazmě asi 200x více). V CSF jsou nižší koncentrace sodných, draselných, vápenatých iontů, anorganických fosfátů a hydrogenuhličitanů, naopak vyšší koncentrace iontů chloridových a hořečnatých oproti plazmě. Iontové složení CSF je stálé a mění se velmi málo (Bloomfield et al. 1998).

Celkový objem CSF činí u kojence 40-60mL a u dospělého člověka 120-180mL. Denně tělo vyprodukuje 500-600mL CSF, přičemž se za den přibližně třikrát obmění. Rychlost tvorby je cca 0,3ml za min a je nezávislá na nitrokomorovém tlaku (ICP). Podle práce doktora Wanifchiho z roku 2002, objem CSF s věkem stoupá a to na úkor mozkového parenchymu. U dětí a mladistvých dochází k nárůstu o 6-7%, u dospělých po 60. roce života o 9% a po 80. roce vzrůst činí 14% původního objemu CSF (Wanifuchi et al. 2002). Sekrece moku je nepřetržitá a to i v případě kdy je znemožněn odtok v důsledku obstrukce. V takové situaci dojde k hromadění CSF, což vede ke zvyšujícím se hodnotám ICP. Hodnota ICP je určena tlakem mozkové tkáně, CSF a krve na skelet lebeční. Zvýšená hodnota kteréhokoliv z kompartmentu intrakrania způsobí vzestup ICP. Souvislosti mezi jednotlivými kompartmenty a ovlivněním ICP vysvětluje tzv. Monroova-Kellieho doktrína. ICP je ovlivněn nejprve žilní krví, pak CSF a nakonec mozkovým parenchymem (Greitz et al. 1992).

CSF plní několik funkcí – mechanickou (ochrannou), homeostatickou a metabolickou. CSF obklopuje mozek a míchu ze všech stran a chrání je tak před otřesy, změnami tlaku a teploty. Dále zajišťuje optimální prostředí pro buňky v centrální nervové soustavě (CNS), jako je stálé iontové složení, pH a osmolaritu. Prostřednictvím CSF jsou buňkám dodávány bioaktivní látky a je zajištěn přesun produktů katabolismu k cílovým orgánům. Nezanedbatelnou roli hraje také při imunitní ochraně před patologickými mikroorganismy.

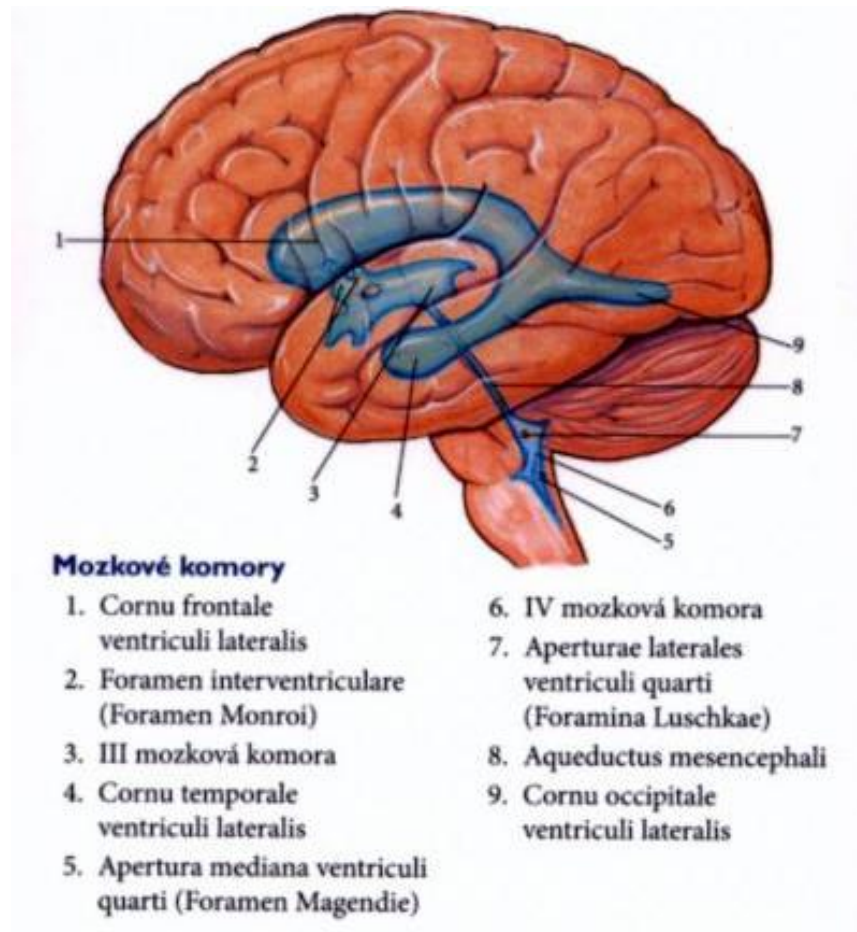
Analýza CSF získává v různých odvětvích (biochemie, imunologie, cytologie) na čím dál větší důležitosti. Stává se i základem neurologické diagnostiky. Vyšetření analytů je nutno vztahovat k jejich koncentraci v plazmě respektive k jejich prostupnosti hematoencefalickou bariérou.

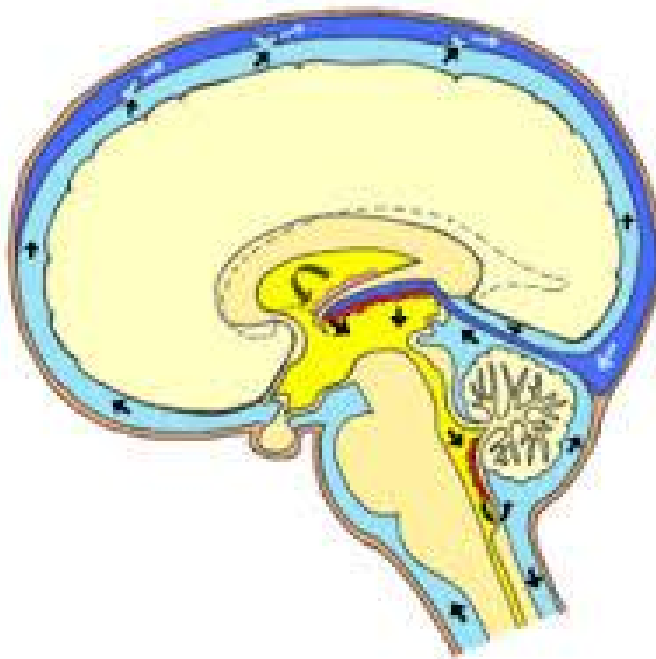
### 2.1.2 FYZIOLOGIE CSF A KOMOROVÝ SYSTÉM

Za fyziologických podmínek proudí CSF v komorovém systému mozku, v cisternách a v subarachnoidálním prostoru mozku a míchy. Většina CSF protéká subarachnoidálním prostorem (80%), zbytek se nachází v mozkových komorách. Ze 40-45% se tvoří ultrafiltrací plazmy (dialyzát krve), dalším způsobem vzniku je aktivní sekrece buňkami plexu choroideu a ependymu jednotlivých mozkových komor. V oblasti plexu choroideu je vytvořena hematoklikorová bariéra, která je zodpovědná za selektivní propustnost látek. CSF protéká z postranních komor přes *foramina Monroi* do třetí mozkové komory. Dále přes *aqueductus Sylvii* přetéká do čtvrté mozkové komory a z ní do subarachnoidálního prostoru nepárovým *foramen Magendii* a párovými *foramina Luschkae* (Milhorat 1974). CSF vyskytující se v subarachnoidálním prostoru obklopuje mozek a míchu, část CSF ze čtvrté mozkové komory protéká dál do centrálního míšního kanálu (Davson et al. 1970). CSF prostupuje do velkých nitrolebečních venózních sinusů přes arachnoidální klky Pacchionských granulací. Během proudění CSF se většina počáteční energie disipuje a menší část se přemění v energii kinetickou. Viskozita CSF ovlivňuje rychlost proudění v určitých oblastech, kdy u stěn mozkových komor je rychlost menší, než ve středu toku (Greitz et al. 1993).

Resorpce je závislá na několika faktorech: tlaku CSF, tlaku v horním šípovém splavu a rezistenci arachnoidálních klků. Hodnoty tlaku v žilních splavech souvisí s tlakem v centrálních žilách. Pohyb CSF je zajišťován srdečním cyklem, kdy během systoly krev proudí do mozku a pulzací tkáně se vytlačuje CSF z lebeční dutiny do páteřního kanálku. Během diastoly krev proudí z lebeční dutiny rychleji a pomocí tkáňové pulzace dochází ke kraníálnímu proudění moku (Griebel et al. 1989). Boční pohled na mozkové komory ukazuje Obr.1 a pohyb CSF je znázorněn na Obr.2.

Obr.1 Mozkové komory - boční pohled (Upraveno podle [www.neurosurg.cz/cs/hydrocefalus](http://www.neurosurg.cz/cs/hydrocefalus))





### 2.1.3 HEMATOENCEFALICKÁ BARIÉRA

Při přestupu hormonů a dalších látek z periférie do mozku a naopak při jejich uvolnění z mozku do krevního řečiště hrají významnou roli dvě bariéry: hematoencefalická bariéra (BBB) a hematolikvorová bariéra. Výměna látek mezi krví a CNS, mezi krví a CSF a mezi CSF a CNS je výše zmíněnými bariérami částečně omezena. To se odráží v rozdílných výsledcích koncentrací látek v krvi a CSF. BBB odděluje cirkulující krev od extracelulární tekutiny a mozkových tkání CNS. Endoteliální buňky v kapilárách CNS a pevné spoje jsou strukturním stavebním podkladem BBB. Pevné spoje omezují endo- a exocytózu. Díky tomuto uspořádání se endoteliální buňky BBB odlišují od výstelky krevního řečiště ostatních tkání (Speake et al. 2001). Membrána BBB tvořící rozhraní ze strany krevního řečiště se označuje jako luminální a ze strany od mozku se jedná o membránu abluminální. Na abluminální membránu nasedají svými výběžky astrocyty a mikrogliální buňky (Abbott et al. 2010; Tajes et al. 2014). Specifické přenašeče přítomné na luminální a abluminální straně regulují transcelulární přenos malých hydrofilních molekul a fungují jako transportní bariéra umožňující vstup nezbytných živin, nebo vyloučení potenciálně škodlivých sloučenin (Begley

& Brightman 2003). Endotel vyskytující se v mozkové části má mnohem nižší transcytózovou aktivitu, než je tomu u periferního endotelu, což přispívá k charakteru transportní bariéry BBB. V kombinaci intracelulárních s extracelulárními enzymy poskytuje BBB také bariéru metabolickou. Nezastupitelnou roli z extracelulárních enzymů zde hrají například peptidázy a nukleotidázy, které zajišťují metabolismus peptidů a adenosintrifosfátu. Na druhou stranu intracelulární enzymy, jako jsou například monoaminoxidázy a cytochrom P450, mohou inaktivovat potenciální neuroaktivní a neurotoxické sloučeniny (Abbott et al. 2010; Begley & Brightman 2003).

BBB má několik rolí. Mezi nejdůležitější patří zásobení mozku základními živinami a zprostředkování vyloučení odpadních látek. To je omezeno iontovou výměnou mezi krví a mozkovou částí, kterou zajišťují specifické iontové transportéry a kanály. Mimo jiné tyto transportéry ovlivňují také produkci tkáňového moku, který poskytuje optimální médium pro neuronální funkce (Abbott et al. 2010). Tkáňový mok má podobné složení jako plazma, ale s nižším obsahem proteinů, nižší koncentrací  $K^+$  a  $Ca^{2+}$  a vyššími hodnotami  $Mg^{2+}$ . BBB chrání mozek před kolísáním iontového složení, které nastává po jídle nebo po fyzické námaze a může tak narušit synaptickou a axonální signalizaci (Cserr & Bundgaard 1984; Begley & Brightman 2003). Bariéra také pomáhá oddělovat skupiny neurotransmiterů a neuroaktivních látek, které působí centrálně (v CNS), nebo periferně (periferní tkáň, krev). Tyto látky pak mohou být použity v obou systémech bez vzájemných zkřížených reakcí.



## 2.2 HYDROCEFALUS

Poruchy tvorby nebo vstřebávání CSF jsou charakteristické pro onemocnění hydrocefalem. Jedná se o etiologicky rozmanité onemocnění, vznikající v důsledku hromadění CSF v mozkových komorách, či subarachnoidálním prostoru. Hydrocefalus může být vrozený, nebo získaný a z hlediska etiologie je lze rozlišit na hydrocefalus idiopatický (bez zjištěné primární příčiny) a na hydrocefalus sekundární (následkem poškození mozkové tkáně).

### 2.2.1 HISTORIE

Název hydrocefalus pochází z řeckého *hydro* (voda) a *kefale* (hlava), a označoval se tak stav, kdy byla “voda v nitrolebeční dutině“. V moderní medicíně tento pojem zpravidla označuje rozmanité onemocnění definované zvýšeným objemem CSF v dilatovaném komorovém systému. Tímto závažným onemocněním trpěli lidé již od pradávna, jak dokazují unikátní archeologické nálezy pozůstatků v Německu, Egyptě a na dalších místech po celém světě (Gjerris & Snorrason 1992). Během let jej popsali například Hippokrates, Galén a da Vinci. V 16. stol. lékař Andreas Vesalius pravděpodobně jako první viděl příčinu hydrocefalu v městnání CSF v komorovém systému. V témže století se také poprvé připojila ke kauzistice tohoto onemocnění i ilustrace a to díky italskému anatomovi jménem Marcus Aurelio Severino (Lyons 1995; Gjerris 1996). Během 17. století bylo provedeno významné množství pitev, jak u nemocných zvířat (hydrocefalická telata), tak u lidí. Byla také poprvé vyslovena domněnka, že zdrojem CSF je glandula pinealis a plexus choroideus. Slavný neuroanatom Franciscuse Sylviuse, podle kterého je pojmenován *aquaeductus Sylvii*, dal základ teorii o cirkulaci mozkomíšního moku a krve (Gjerris & Snorrason 1992; Adeloje 1977). První konkrétnější zmínka o léčbě hydrocefalu pochází z konce 18. stol. a je připisována Peyrilhemu, který doporučoval navrtat lebku a následně ji stáhnout lýkem. Tento postup se zachoval až do počátku 19. stol. (Helcl 1998). Druhá polovina 19. stol. patřila neuroanatomům a jejich objevům komorového systému, které vyústily v roce 1875 ve studii dvou švédských badatelů Axela Keye a Gustafa Retziuse o resorpci CSF. O čtyři roky později anglický chirurg John Hilton označil za jednu z příčin hydrocefalu mechanickou překážku a začalo se tak uvažovat o chirurgických postupech léčby (Miyagami et al. 1975; Helcl 1998). Dalším zlomovým okamžikem pro léčbu hydrocefalu byla první lumbální punkce, kterou provedl na konci 19. stol. Heinrich Quincke a stal se také jejím propagátorem. S příchodem dalšího století se otevřely dveře nejrozličnějším chirurgickým operacím, punkcím a drenážím.

Již v roce 1908 německý chirurg Walther Kausch popsal postup při drenážní operaci s odvedením nadbytečného CSF pomocí gumové hadičky z postranní komory do dutiny břišní. Tento způsob ovšem nemohl být ještě dlouhá léta rozšířen, neboť bylo nutné nejprve vyvinout potřebný ventil usměrňující tok CSF. Lékaři se snažili během následujících let vytvořit komunikaci mezi postranními mozkovými komorami a subarachnoidálním prostorem, později pak také s peritoneální dutinou (Canale & Longo 1990; Lanzino et al. 1997). V roce 1920 byla vyslovena první myšlenka na fenestraci spodiny třetí komory, a to Jasonem Mixterem. Na něj navázali Davidoff a později Stookey a Scarff. O téměř 20 let později navrhnul Arne Torkildsen ventrikulo-cisternální drenáž (shunt), a zajistil tak komunikaci mezi postranní komorou a velkou cisternou. Tato forma drenáže se s inertními materiály může využívat u určitých druhů hydrocefalu i dnes (Alp 1995). S větší informovaností o fyziologii a patofyziologii CSF šly výzkum a chirurgické postupy rychle dopředu. Ještě před 2. světovou válkou se prováděly ventikuloperitoneální i lumboperitoneální drenáže, ovšem bez přítomnosti jednocestného ventilu. V roce 1949 byla poprvé implantována ventrikulo-peritoneální drenáž využívající jednocestný polyetylenový ventil a to Frankem Nulsenem a Eugenem Spitzem. Odstartovali tak vývoj vhodných materiálů jak pro drenáž, tak i pro ventily a společně s Johnem Holterem dali základ výroby ventilů Spitz-Holter, které dnes zná celý svět (Nulsen & Spitz 1951; Aschoff et al. 1999). Díky tomuto trendu přetrvávajícímu dodnes, se staly drenáže ventrikulo-peritoneální a ventrikulo-atriální běžně prováděnými výkony a nemalou měrou přispěly ke zkvalitnění života pacientů.

## **2.2.2 CHARAKTERISTIKA ONEMOCNĚNÍ**

Hydrocefalus vzniká hromaděním CSF v komorách či subarachnoidálním prostoru a to buď vlivem zvýšené sekrece (hypersekrece), snížené resorpce CSF (hyporesorpce), nebo obstrukcí. Podle etiologie onemocnění můžeme rozdělit hydrocefalus na několik základních typů.

### **2.2.2.1 OBSTRUKČNÍ HYDROCEFALUS**

Obstrukční hydrocefalus je způsoben mechanickou blokáží v některém z úseků komorového systému, čímž dojde k narušení přirozené cirkulace CSF. Překážkou mohou být patologické změny jak vrozené, tak získané. Mezi získané patologie patří nejrůznější druhy infekcí, jako např. toxoplazmóza, cytomegalovirus, virus rubeoly, příušnice či parainfluenza. Poměrně významnou část zastupují nádorové změny, kdy jejich expanze či prorůstání způsobí přerušování cirkulace CSF. K rozvoji hydrocefalu může vést také krvácení do mozkových komor (Angelopoulos et al. 1995). Mezi vzácnější příčiny vzniku patří ischemický infarkt, krvácení do parenchymu a meningitida (Nakaguchi & Miyamoto 2001; Sulla et al. 1989).

### **2.2.2.2 KOMUNIKUJÍCÍ HYDROCEFALUS**

Tento typ hydrocefalu vzniká převážně při poruše resorpce CSF a vzácně při jeho hypersekreci. CSF je vstřebáván v arachnoidálních granulacích, kde může dojít k poškození například v důsledku subarachnoidálního krvácení či meningitidy (Foltz & Ward Jr 1956). Poškození granulace může být také při trombóze žilního splavu či žilní hypertenzi při malformacích Galénovy žíly. Delší dobu je známo, že také zvýšená hladina bílkovin v CSF může vést ke vzniku tohoto typu onemocnění (Harris 1962).

### **2.2.2.3 NORMOTENZNÍ HYDROCEFALUS**

Jedná se o speciální formu komunikujícího hydrocefalu. Poprvé termín normotenzní hydrocefalus (NPH) použili ve své práci Hakim a Adams v roce 1965 (Hakim & Adams 1965). Autoři popsali syndrom NPH jako rozšířený komorový systém bez známek elevovaného ICP. Onemocnění propuká především u dospělých osob, a to zejména ve vyšších věkových skupinách. Příčina této formy nemoci je stále nejasná. Může tak být idiopatická, nebo mu předchází subarachnoidální krvácení, meningitida či úraz. V následujících kapitolách se budeme věnovat tomuto typu hydrocefalu.

### 2.2.3 KLINICKÉ PŘÍZNAKY NPH

Příčiny vzniku NPH nejsou zcela jasné. Předpokládá se, že NPH se rozvíjí v důsledku arachnoidální fibrózy, čímž dojde k narušení komunikace CSF mezi bazálními cisternami a subarachnoidálními granulacemi (Bech et al. 1997). Náhlý uzávěr mozkových cest vede k hromadění CSF a k dilataci komorového systému. Dojde k vyčerpání rezervní kapacity žil a mozkového prostoru, což zapříčiňuje vymizení subarachnoidálního prostoru. Mezi tlakem CSF v komorovém systému a tlakem v subarachnoidálním prostoru v oblasti hemisfér je tlakový gradient, který přispívá ke zvětšení komorového systému (Marmarou et al. 2005; Lyons & Meyer 1990). Klinické příznaky u NPH se liší podle rychlosti a způsobu jeho vzniku, důležitou roli hraje také věk pacienta. NPH se projevuje triádou příznaků (Hakimova trias) zahrnující poruchy chůze, kognitivní deficit a močovou inkontinenci (Hebb et al. 2001).

Problémy s chůzí se obvykle objeví jako první a bývají nejvýraznějším příznakem triády. V důsledku rozšíření komorového systému, zejména v laterální oblasti, dojde k utlačení kortikospinálních motorických vláken, které ústí do lumbo-sakrální oblasti spinální míchy a nedochází tak ke správnému přenosu vzruchů. Potíže se kvalifikují podle míry postižení na mírné, časté a závažné (Krauss et al. 2001). V časných stádiích pacient pociťuje problémy s rovnováhou, slabost, rychleji se dostaví únava, zejména při chůzi do schodů, nebo při překračování překážek. Při pohybu je pacient shrbený s osou těla nakloněnou vpřed a pohybuje se krátkými šouravými kroky. S tímto způsobem pohybu se setkáváme i u pacientů s Parkinsonem, ovšem u NPH není výrazný třes těla a ztuhlost. S postupem onemocnění dochází k poklesu výšky kroku, až se může zdát, že pacient nezvedá chodidlo z podlahy. Tento styl je nazýván jako magnetická chůze (Kuba et al. 2002).

Rozvoj demence je všeobecně považován jako výsledek narušení frontálního laloku a oblasti limbického systému. Výsledkem jsou kognitivní změny v důsledku postupující neurodegenerace, jako jsou např. poruchy pozornosti, zpomalení myšlenkového procesu, apatie, poruchy učení a ztráta motivace (Marmarou et al. 2005; Relkin et al. 2005). Pokles kognitivních funkcí může být dán věkem, v jiných případech se může jednat o projevy neurodegenerace. Správná diagnostika kognitivních poruch je obtížná. U pacientů s NPH bývají zaznamenány podobné klinické příznaky jako u pacientů s Alzheimerovou (AD) nebo Parkinsonovou chorobou (Devito et al. 2005). Na rozdíl od AD nebo cévních mozkových onemocnění, však NPH nevykazuje žádné specifické změny v mozkovém parenchymu (Bech et al. 1997).

Močová inkontinence se objeví až později v průběhu nemoci. Ze všech příznaků je nejméně prozkoumaná. Močové problémy u NPH se zdají být z velké části zapříčiněny hyperaktivitou detruzoru (Sakakibara et al. 2008). Zpočátku se jedná pouze o zvýšenou frekvenci a urgenci bez úniku moče, s pozdější progresí se může změnit v trvalou inkontinenci.

Kompletní triáda je manifestována přibližně u poloviny nemocných (Marmarou et al. 2005). Zbylí pacienti vykazují pouze některé z příznaků triády, což znesnadňuje diagnostiku onemocnění. Kvůli relativně nespecifickým projevům je stále problematické odlišit NPH od jiných neurodegenerativních onemocnění.

#### 2.2.4 DIAGNOSTIKA A LÉČBA NPH

NPH je operativně léčitelný neurologický syndrom vyskytující se především u starší věkové skupiny lidí. Podle populační studie provedené ve Švédsku je prevalence NPH u osob mezi 70-79 lety 0,2% a 5,9% u 80-ti letých a starších. Incidence se pohybuje mezi 2-6% a to bez rozdílu pohlaví (Jaraj et al. 2014; Picascia et al. 2015). Nespecifické pomalu se rozvíjející příznaky stojí za tím, že NPH je stále jedním z nejvíce poddiagnostikovaných onemocnění. Podle výzkumu z roku 2009 bylo zjištěno, že pouze 20% NPH je správně diagnostikováno a adekvátně léčeno (Brean et al. 2009).

Základním diagnostickým prvkem je vyšetření za pomoci zobrazovacích technik a to zpravidla počítačové tomografie nebo magnetické rezonance (Ng et al. 2009). Ty mají za úkol vyloučit jinou strukturální lézi a posoudit tvar a velikost komorového systému. K potvrzení diagnózy je nutný nejen nález ventrikulomegalie, ale i likvorodynamické vyšetření. Mezi nejčastější patří tzv. tap test, lumbální punkce, lumbální infúzní test a zevní lumbální drenážní test.

##### 2.2.4.1 LUMBÁLNÍ INFÚZNÍ TEST

Snaha o precizní diagnostiku u patologických změn dynamiky CSF vedla k zavedení tzv. lumbálního infúzního testu (LIT). Při LIT je neprve provedena lumbální punkce, kdy je odvedeno 30-50mL CSF a následná aplikace Ringerova nebo fyziologického roztoku do páteřního kanálu. LIT má vyšší senzitivitu i specificitu než samotná lumbální punkce a parametrem vypovídajícím o dynamice CSF jsou změny tlaku způsobené při vyrovnávání vnitřních podmínek organismu. Čím větší je vzestup tlaku, tím více je narušena dynamika CSF a jeho resorpční schopnosti. LIT byl navržen již v roce 1948 Foldsem a Arrowoodem,

ale až o téměř 20 let později jej přesněji popsali Katzman a Hussey. Na základě série testů bylo stanoveno, že se za minutu vytvoří  $0,323 \pm 0,015 \text{ mL CSF}$ . Podle Katzmana a Husseye rychlost tvorby CSF není závislá na tlaku, ovšem jeho resorbce již závislá je (Schutz et al. 1983; Katzman & Hussey 1970). Při pozorování bylo zjištěno, že zdroj nepřesností vychází z elasticity tvrdé pleny a roztažitelnosti žilního pletence. Žíly jsou za vysokého tlaku kontrahovány a za nízkého dilatovány. V průběhu let byla využívána Katzmanova technika, kdy se v během LIT dosahuje tzv. „steady-state“. Při měření je tak důležitý okamžik, kdy je tlak v komorovém systému ustálen po dobu 5 minut, či mírně osciluje kolem určité hodnoty a zároveň se snaží nepřekročit hodnotu 50mmHg (Meier 2003; Sokić et al. 1992). LIT bývá většinou snášen bez problémů. Komplikace mohou nastat v okamžiku, kdy je zvýšený tlak CSF nad 70mmHg. Mezi nežádoucí efekty patří oběhová hypertenze, hyperventilace, tremor, pocení a parestezie. Nelson a Goodman modifikovali původní způsob provedení LIT a to na časově úspornější formu tzv. modifikovaný Katzmannův test, kdy je pacientům provedena lumbální punkce jehlou napojenou na tlakoměr a na infuzi roztoku. Určitou rychlostí je roztok vpraven do míšního kanálku, po dosažení „steady-state“ je podle vzorce vypočítán výtokový odpor. (Kahlon et al. 2005; Vanek & Sames 2003).

$$R_{out} = P_{max} - P - P_s / X$$

*R<sub>out</sub> - výtokový odpor; P<sub>max</sub> - finální hodnota tlaku; P - iniciální hodnota tlaku; P<sub>s</sub> - odpor systému měřený při průtoku tekutiny; X - hodnota infuze (mL/min)*

#### **2.2.4.2 LUMBÁLNÍ DRENÁŽNÍ TEST**

Lumbální drenážní test (LDT) je diagnostický nebo léčebný výkon, při kterém je CSF odváděn do uzavřeného systému mimo tělo pacienta po několik dní. Zákrok umožňuje sledovat či upravit objem a tlak CSF v těle, dále také pravidelně vyšetřit CSF či aplikovat léky. Používá se jako imitace podmínek před zvažovanou operací. Při pozitivní reakci na LDT se předpokládá, že zavedení shuntu povede k dlouhodobému zlepšení stavu pacienta.

### 2.2.4.3 OPERATIVNÍ LÉČBA

U pacientů, kteří mají pozitivní LIT nebo LDT se přistupuje k operativní léčbě. Cílem operace je buď odstranění překážky, nebo trvalé odvádění CSF pomocí drenážních systémů (Bondurant & Jimenez 1995). Podstatou operace je odvod přebytečného CSF z mozkových komor do místa, kde se může CSF bez problémů vstřebat (nejčastěji peritoneum). Nejpoužívanějším typem drenáže je zavedení ventrikulo-peritoneálního shuntu (VPS). VPS je zaveden obvykle v temeno-týlní oblasti a dále veden jako katetr podkožím až do peritonea. Součástí systému je jednocestný ventil umístěný za uchem, na kterém se dá nastavit objem odváděného CSF. CSF je tak odváděn do peritonea, kde se samovolně vstřebává, může být snadno odebírán a opětovně analyzován. Po zavedení shuntu dochází k rapidnímu zlepšení stavu pacienta, který je brzy propuštěn do domácího ošetření. Dále však dochází na kontroly ambulantně a to vždy v předem domluvených periodách. Další kontroly jsou pak naplánované po 1-2 letech, či při jakékoliv změně klinického stavu (Kubo et al. 2001; Chen et al. 1994). Již v roce 1974 byl zveřejněn článek o problematice výběru pacientů, u kterých je možno provést drenážní operaci (Wood et al. 1974). Zavedení VPS je problematické u obézních lidí a u lidí po vícečetných laparotomiích. Pacienti, kteří již před operací měli závažné neurologické problémy, jako je subarachnoidální krvácení, cévní mozková příhoda, kraniocerebrální trauma, neurochirurgická operace mozku či míchy, vykazují nepříznivé pooperační výsledky. Dále u pacientů starších 85-ti let dochází ke kontraindikaci s dalšími komplikovanými onemocněními. Zlepšení klinického stavu nemusí být trvalé, a bohužel v některých případech dochází po nějaké době k opětovnému zhoršení. Zásadní roli v léčbě NPH hraje jeho včasná diagnostika. V pozdějších stádiích onemocnění již může docházet k rozvoji změn trvalejšího charakteru a zavedení shuntu již nemá tak výrazný efekt.

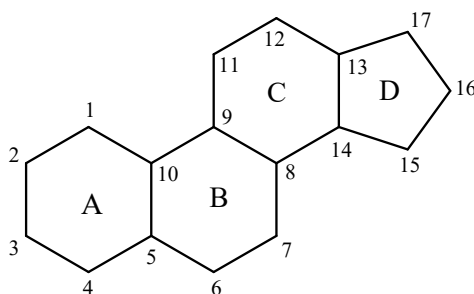
## 2.3 STEROIDNÍ HORMONY

### 2.3.1 ÚVOD

Steroidní hormony jsou multifaktoriální hráči, kteří významně zasahují do průběhu fyziologických dějů. Pomáhají kontrolovat metabolismus, imunitní funkce, zánětlivé reakce a vyvážení vody a minerálů v těle. Steroidy jsou na místo účinku přiváděny tělními tekutinami (krev, CSF, tkáňový mok, míza). Transport po těle je zajišťován vazbou na transportní bílkovinu, která dopraví hormon na místo určení. Je nutné vzít na vědomí, že pouze volné steroidy jsou biologicky aktivní. Cílová buňka musí být vybavena receptorem pro příjem signálu a také převodním systémem pro jeho zpracování. Díky své lipofilní povaze mají steroidy schopnost procházet BBB a na genomové úrovni ovlivnit změny nálad nebo chování, účinky se však projeví relativně pomalu (minuty až hodiny) (Rousseau 2013). Steroidní hormony mají široké pole působení a tak stejný signál může spustit více různých reakcí.

Steroidy patří podle své stavby mezi izoprenoidy, což jsou látky vyskytující se napříč živou přírodou. Najdeme zde pohlavní a korové hormony obratlovců, svlékací hormony bezobratlých, žlučové kyseliny, fytohormony, vitamíny a celou řadu dalších látek. Základem steroidních hormonů je organická molekula cyklopentanoperhydrofenantren, ve starší literatuře označována jako steran (Obr.3). Jejich fyziologické účinky vykazují značnou rozmanitost, která je ovlivněna modifikací skeletu v závislosti na navázání různých funkčních skupin.

*Obr.3 Cyklopentanoperhydrofenanthren*



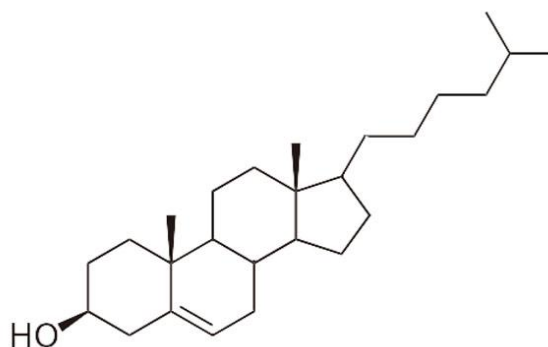


Podle místa tvorby je steroidy možné rozdělit na dvě základní skupiny a to na kortikosteroidy a pohlavní steroidy. Kortikosteroidy jsou produkovány kůrou nadledvin a řadí se mezi ně glukokortikoidy a mineralokortikoidy. Glukokortikoidy regulují katabolické děje a to především rozklad glykogenu, tuků a bílkovin, dále u nich byly prokázány protizánětlivé účinky. Mineralokortikoidy se starají o správné hospodaření s vodou a minerály a jejich místo působení je především v ledvinách. Gonády a placenta produkují pohlavní hormony, mezi něž patří androgeny, estrogeny a gestageny. Androgeny jsou mužské pohlavní hormony, které ovlivňují vývoj pohlavních orgánů a sekundárních pohlavních znaků. Estrogeny jsou zásadní pro správné dospívání, sexuální vývoj u dívek a blokují sekreci gonadotropinů, čímž ovlivňují menstruační cyklus. Podílejí se také na metabolismu cholesterolu. Gestageny tvoří skupinu ženských pohlavních hormonů, které působí antiestrogenním účinkem. Jedním z hlavních účinků je maturace endometria v druhé polovině menstruačního cyklu a iniciace příprav děložní sliznice pro přijetí vajíčka. V těle najdeme také neuroaktivní steroidy, které mají speciální místo účinku. Pod tímto názvem se skrývají všechny steroidy mající vliv na nervovou aktivitu a ve všech výše zmíněných skupinách se nachází steroidy s těmito neuroaktivními vlastnostmi (Standrig 2005; Trojan 2003).

### 2.3.2 BIOSYNTÉZA

Steroidní hormony jsou v lidském těle syntetizovány z cholesterolu. Cholesterol vychází ze steranu, k němuž je v pozici 17 připojen osmiuhlíkatý postranní řetězec (C20 – C27) a na pozicích 18 a 19 se nachází dvě metylové skupiny (Obr.4). Při odstranění části postranního řetězce získáme tzv. C21 steroidy (gestageny, kortikosteroidy), po dalším zkrácení tzv. C19 steroidy (androgeny) a po ztrátě metylové skupiny v pozici 19 a aromatizaci A kruhu vznikají tzv. C18 steroidy (estrogeny).

*Obr.4 Chemická struktura cholesterolu*



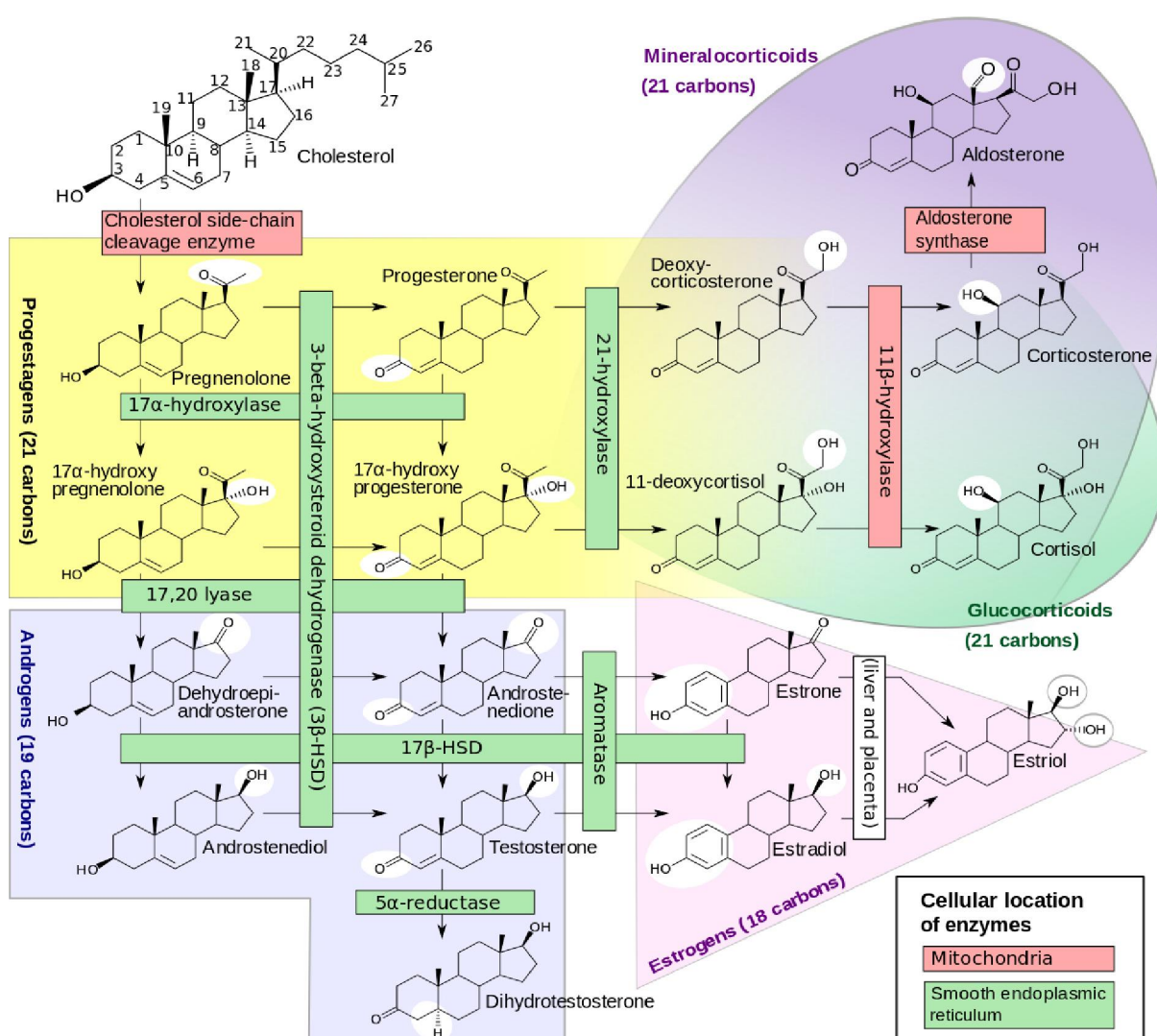
Biosyntéza je mimo jiné regulována přenosem cholesterolu z vnější na vnitřní membránu mitochondrií. Přenos je zajištěn steroidogenním akutním regulačním proteinem (StAR) a translokačním proteinem (TSPO) (Lavaque et al. 2006; Papadopoulos et al. 2006). Biosyntetická dráha steroidů probíhá na vnitřní membráně mitochondrií za účasti enzymatického systému cytochromu P450<sub>scc</sub>, kdy je nejprve vytvořen pregnenolon jakožto prekurzor všech steroidních hormonů. Za konverzi C21 steroidů na C19 je zodpovědný enzymatický systém 17 $\alpha$ -hydroxyláz. Tato přeměna vede přes meziprodukt, kterým je 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolon (17 $\alpha$ -OH-pregnenolon). Jeho hladiny během dospívání stoupají, nejvyšší hodnoty jsou naměřeny na konci puberty, pak jeho koncentrace v těle klesá (Hill et al. 1999). V roce 2004 byla potvrzena hypotéza o syntéze 17 $\alpha$ -OH-pregnenolon v mozkové tkáni *de novo* a zařadil se tak do skupiny neurosteroidů (NS) (Matsunaga et al. 2004). Významným zástupcem skupiny C19 je dehydroepiandrosteron (DHEA). DHEA je vedle cholesterolu nejhojnějším cirkulujícím steroidem v krvi. Hlavním zdrojem je kůra nadledvin,

ale nachází se ve vysokých koncentracích i v mozkové tkáni. Hladiny cirkulujícího DHEA klesají s věkem a korelují s mírou degenerativních změn (HAMPL et al. 2003; Kihel 2012). Účinky tohoto „hormonu mládí“ byly zkoumány v mnoha klinických studiích, kdy se jednak měřily změny hladin při různých fyziologických a patofyziologických stavech, tak i celkový stav organismu při cíleném podávání DHEA (Baulieu et al. 2000; Kalimi et al. 1994; HAMPL et al. 1997). Významným objevem se stala také skutečnost, že DHEA zmírňuje nepříznivé účinky glukokortikoidů (Kalimi et al. 1994). S deriváty DHEA souvisí enzym z rodiny hydroxysteroidních dehydrogenáz (HSD) a to 11 $\beta$ -HSD (typu 1 a 2), která mimo jiné katalyzuje přeměny neuroaktivních metabolitů DHEA - 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA (7 $\alpha$ -OH-DHEA), 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA (7 $\beta$ -OH-DHEA), 7-oxo-DHEA a dále pak 7 $\alpha$ -hydroxyepiandrosteron (7 $\alpha$ -OH-epiandrosteron) (Hennebert et al. 2007). Posledně zmíněný hormon působí jako endogenní androgenní derivát DHEA a byly u něj prokázány protizánětlivé a imunoprotektivní účinky (Dudas et al. 2004; Niro et al. 2012). Dalším enzymem zapojeným do syntézy steroidů je 3 $\beta$ -HSD, která zajišťuje přeměnu DHEA na androstendion, což je androgenní steroid vylučovaný varlaty, vaječníky a kůrou nadledvin. Má slabší účinnost než testosteron, na který je pomocí 17 $\beta$ -HSD je přeměňován. Tento enzym byl mimo jiné detekován také v mozkové tkáni (Guennoun et al. 1995). 3 $\beta$ -HSD stojí i za přeměnou pregnenolonu na progesteron. Progesteron se tvoří především ve žlutém tělisku, v období těhotenství je secernován placentou a byly u něj mimo jiné prokázány také neurosteroidní vlastnosti (Baulieu & Schumacher 2000). Díky 21 $\alpha$ -hydroxyláze se přeměňuje progesteron na deoxykortikosteron, což je neaktivní forma hormonu kortikosteronu, který se řadí mezi glukokortikoidy. Společně s kortizolem mají vliv na některé metabolické procesy, činnost nervového systému, celkový vývoj organismu a nezastupitelnou roli hrají při regulaci stresové odpovědi. Regulace probíhá přímo v cílových buňkách, kde se aktivní kortizol přeměňuje na inaktivní kortizon a naopak. Tuto reakci katalyzuje enzym podílející se na přeměně 7-hydroxylovaných metabolitů DHEA, 11 $\beta$ -HSD. Exprese enzymu je pozorována v různých tkáních organismu (játra, tuk, gonády, mozek) (Blum & Maser 2003; Draper & Stewart 2005). Mineralokortikoid aldosteron vzniká aldosteron-syntázou z kortikosteronu a jeho úkolem je regulace natrémie, kalémie a stav extracelulární tekutiny v organismu. Společně s kortizolem kompetuje o vazebné místo na mineralokortikoidním receptoru, ovšem hladina kortizolu je v krvi mnohonásobně vyšší a aldosteron by se tak nemohl vázat. Tento problém je vyřešen přítomností 11 $\beta$ -HSD typu 2, která má pro kortizol vysokou afinitu a svými

oxidačními účinky snižuje koncentraci aktivního glukokortikoidu v cirkulaci (Blum & Maser 2003).

Jednotlivé izoformy zmíněných enzymů působí jak redukčně, tak i oxidačně a celý proces je variabilní. Zjednodušené schéma s vyznačenými směry reakcí a jednotlivými enzymy účastnícími se steroidogeneze je znázorněno na Obr.5.

Obr.5 Zjednodušené schéma steroidogeneze (Převzato z (Häggström 2014))



### 2.3.3 NEUROSTEROIDY

Skupina steroidů spřažených s neuronální excitabilitou je známá jako neuroaktivní steroidy (NAS), jejichž podskupinou jsou steroidy syntetizující se přímo v mozku *de novo* – neurosteroidy (NS). Poprvé tuto *de novo* syntézu popsala v roce 1980 skupina kolem významného endokrinologa doktora Baulieu. Ti jako první zjistili, že pregnenolon, DHEA a jejich sulfáty mají vyšší koncentraci v neuronální tkáni než v plazmě. Další výzkumy prokázaly, že tyto steroidy zůstávají v nervovém systému dlouho poté, co byla zvířeti provedena gonadektomie a adrenalektomie (Corpéhot et al. 1981; Akwa et al. 1993). Na rozdíl od cirkulujících steroidních hormonů, které působí na dlouhou vzdálenost od jejich místa vzniku, NS působí na nervový systém auto-nebo para-křinním způsobem (Nahar et al. 2007).

NS jsou *de novo* syntetizovány z cholesterolu nebo ze steroidních prekurzorů pocházejících z periferních zdrojů. Tyto látky se mohou na rozdíl od klasických steroidních hormonů akumulovat v různých buněčných strukturách CNS nebo periferní nervové soustavě (Schumacher et al. 1993; Zwain & Yen 1999). Syntéza probíhá za přítomnosti enzymu P450, který byl detekován v izolovaných oligodendrocytech a Schwannových buňkách. Biosyntéza specifických steroidů je tkáňově-, buněčně- a vývojově- závislá na specifické expresi enzymů a to díky vícenásobné enzymatické aktivitě u mnoha steroidních hydroxyláz. Biosyntéza je velmi podobná té, která probíhá v dřeni nadledvin, gonádách a placentě (Akwa et al. 1993; Mizee et al. 2014) .

Výzkumy poukázaly na možné využití NS při léčbě neurologických a psychiatrických onemocnění. Již v 90. letech 20. století byly na zvířecích modelech prokázány antikonvulzivní účinky, které do značné míry korelují s účinky klasických epileptik. NS tak mají léčebný potenciál jak při samotných záchvatech, tak při jejich předcházení. Díky výborným výsledkům na animálních modelech se mohlo nedávno přejít ke klinickým studiím (Rogawski & Porter 1990; Gasior et al. 1999; Reddy 2010). Jiné výzkumy se soustředily na možnost nahrazení dostupných anxiolytik přirozeně se vyskytujícími NS, jako jsou metabolity progesteronu, pregnenolonu, allopregnanolonu, nebo jejich syntetickými analogy (Beekman et al. 1998; Longone et al. 2011). NS hrají také roli při léčbě nespavosti. Pregnenolon a allopregnenolon jsou známy svým zkracujícím účinkem na dobu potřebnou k usnutí, čímž dojde k prodloužení non-REM fáze spánku. U lidí je délka nepřerušované non-REM fáze ukazatelem kvality spánku (Lancel et al. 1996; Barbaccia et al. 1997). Podstatnou roli hrají

NS při poruchách paměti a neurodegeneraci. Jejich vliv byl prokázán u onemocnění, jako jsou AD, vaskulární demence, roztroušená skleróza, hydrocefalus a další (Kim et al. 2003; Kancheva et al. 2010; Ueno et al. 2015; Sosvorova et al. 2015 d). Stále je však mnoho nezodpovězených otázek ohledně mechanismu působení jednotlivých NS, včetně jejich využití v klinické praxi. Shrnuté účinky společně s výsledky jednotlivých studií u vybraných NS jsou zobrazeny v Tab.1.

### **2.3.3.1 MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY NEUROSTEROIDŮ**

Na rozdíl od steroidů syntetizovaných ve steroidogenních tkáních mají NS mechanismus účinku převážně negenomový. Tato odezva na steroidem nesený signál je velice rychlá a to řádově v sekundách až minutách. V případě negenomových účinků nedochází k ovlivnění transkripce genů, ale mechanismus spočívá především v ovlivňování excitability nervových buněk. NS se vážou na membránové ionotropní receptory ovlivňující propustnost iontových kanálů, dále pak mají neuroprotektivní účinky a regulují myelinizaci, růst axonů a dendritů (Baulieu 1998). Selektivní změny koncentrací NS v mozkové oblasti, byly zjištěny během různých environmentálních situací, jako je například sexuální chování, vývoj, posilování paměti, těhotenství a stres (Flood et al. 1995; Vallée et al. 1997; Baulieu 1988). NS moduluji funkce receptorů kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné typu A ( $GABA_A$ ), glycinových, glutamátových či cholinergních (Harrison & Simmonds 1984; Wu et al. 1990; Bullock et al. 1997; Wu et al. 1991). Blíže se zaměříme na glutamátový N-methyl-D-aspartátový receptor (NMDA) a receptor  $GABA_A$ , jakožto hlavní zástupce receptorů zprostředkující excitační a inhibiční odpovědi iontových kanálů.

GABA je neuropřenašečem s inhibičními účinky a svým působením aktivuje iontové kanály propustné pro chloridové ionty (Moss & Smart 2001; Reddy 2006).  $3\alpha$ -redukované a  $3\alpha$ -hydroxylované metabolity progesteronu a deoxykortikosteronu jsou potencionální endogenní pozitivní alosterické modulátory  $GABA_A$  receptoru (Majewska et al. 1986; Lambert et al. 1995; Carver & Reddy 2016). Když se tyto NS stereoselektivně naváží na určité místo receptorového komplexu, dojde k zesílení účinků GABA. *In vivo* je možné pozorovat anxyolitické, sedativní, hypnotické či antikonvulsivní efekty způsobené touto vazbou (Rick et al. 1998). U laboratorních potkanů byla při pokusech s různými dávkami kortikosteronu již po několika minutách pozorována změna v aktivitě neuronů, vedoucí až k behaviorálním změnám (Bicikova et al. 2004; Kazihnitkova et al. 2004). Jako negativní modulátor, tedy neuroaktivátor, v těle účinkuje např. pregnenolon sulfát, který účinky

odpovědi GABA<sub>A</sub> receptorů snižuje (Majewska 1992). Pozitivní modulace GABA<sub>A</sub> receptorů je způsobena již při nanomolární koncentraci steroidů, zatímco u negativní modulace je účinku dosaženo až při mikromolárním množství.

Klíčový význam NMDA receptorů je spjat se synaptickou plasticitou, konkrétně s procesy významnými pro učení a paměť, a to s dlouhodobou potenciací a depresí (Lynch 2004). Mimo jiné tyto receptory hrají významnou roli při buněčné excitotoxicitě (Arundine & Tymianski 2003) a při vzniku patologických stavů CNS popsané u AD, schizofrenie či Parkinsonovy choroby (Rothstein 1995; Doble 1999; Doraiswamy 2003; Domínguez et al. 2006; Rotaru et al. 2011). Výše zmíněné vlastnosti udělaly z NMDA receptorů možný cíl farmakologického zásahu. NS mohou na tento typ receptoru působit jak pozitivně, tak negativně a modulují tak vtok Ca<sup>2+</sup> iontů do nervové buňky. Pozitivně ovlivňují a mezi neuroaktivátory se řadí DHEA, pregnenolon a jejich sulfáty (Compagnone & Mellon 2000; Plassart-schiess & Baulieu 2001; Maninger, Owen M Wolkowitz, et al. 2009). Opačným způsobem funguje pregnanolon sulfát, což je endogenní NS s inhibičními účinky. Při navázání na receptor dojde ke snížení pravděpodobnosti otevření kanálu a jeho vliv je tedy neuroprotektivní (Park-Chung et al. 1994; Petrovic et al. 2005).

Rozdílný efekt působení stejného neurosteroidu v různých částech nervové soustavy na receptory je pravděpodobně způsoben odlišným uspořádáním podjednotek receptoru (Lambert & Grover 1995; Lambert et al. 1995; Belelli et al. 1996), což vede k vysoké variabilitě při využití NS během léčebných postupů.

Tab.1 Přehledová tabulka účinků vybraných neuroaktivních a dalších steroidních hormonů souvisejících s diplomovou prací;

symbol \* označuje studie provedené na animálním modelu

ANALYT	ÚČINKY	ZÁZNAMY V LITERATUŘE
DHEA	neuroprotektivní protizánětlivé imunomodulační pozitivní regulátor NMDA receptorů metabolismus sacharidů	nízké hladiny u neurodegenerativních onemocnění (Kancheva et al. 2011; Sosvorova et al. 2015 b) pozitivní účinek na kognitivní funkce (Moffat et al. 2000; Sherwin 2003) korelace s mírou degenerativních změn v centrální nervové soustavě (Kihel 2012) zvýšené hladiny u pacientů s depresemi (Wolkowitz & Reus 2003; Maninger et al. 2009) zmírnění účinku glukokortikoidů (Kalimi et al. 1994)
7α-OH-DHEA 7β-OH-DHEA	neuroprotektivní imunomodulační	narušena syntéza 7-oxygenovaných metabolitů u AD (Kim et al. 2003) nízké hladiny u NPH ( Sosvorova et al. 2015 b)
7-oxo-DHEA	neuroprotektivní termogeneze	narušena syntéza 7-oxygenovaných metabolitů (Kim et al. 2003) prokázaný anti-obežity efekt, randomizovaná studie (Zenk et al. 2007)
16α-OH-DHEA	neuromodulační anti-imunoprotektivní	působení proti 7-oxygenovaným metabolitům DHEA (Morfin & Stárka 2001) vysoké hladiny u NPH (Sosvorova et al. 2015 b)
DHEAS	neuroprotektivní antidepresivní pozitivní modulátor NMDA receptorů negativní modulátor GABA receptorů	snížené hladiny u pacientů s AD (Leblhuber et al. 1990; Hillen et al. 2000) snížené hladiny u pacientů s depresemi (Kurita et al. 2013; Hill et al. 2016) posílení excitačního postsynaptického potenciálu (Yoo et al. 1996) *
7β-OH-Epiandrosteron	neuroprotektivní protizánětlivý	snížené hladiny u animálního modelu AD (Dudas et al. 2004) * studie na laboratorních potkaních (Hennebert et al. 2008) *
Kortizol	protizánětlivý imunomodulační metabolismus sacharidů, tuků stresový hormon	zvýšené hladiny u roztroušené sklerózy (Kancheva et al. 2010) zvýšené hladiny u pacientů s AD (Popp et al. 2009) zvýšené hladiny u pacientů s NPH (Sosvorova et al. 2015 b)
Aldosteron	neuromodulační mineralokortikoid hospodaření s vodou v těle	ukazatel pro celkový stav pacienta při nádorech na mozku (Tenedieva et al. 1994) zvýšené hladiny u pacientů s NPH (Sosvorova et al. 2015)
Pregnenolon	neuroprotektivní pozitivní modulátor NMDA receptorů	zvýšené hladiny u epilepsie (Hill et al. 2011) zvýšené hladiny u pacientů s panickou poruchou (Brambilla et al. 2003) zvýšené hladiny u pacientů se schizofrenií (Bicikova et al. 2013)
Pregnenolon sulfát	neuroprotektivní pozitivní modulátor NMDA receptorů	snížené hladiny u pacientů s depresemi (Hill et al. 2016) snížené hladiny u pacientů se sociální fobií nebo úzkostlivou poruchou (Heydari & Le Mellédo 2002) zlepšení kognitivních schopností (Sabeti et al. 2007; Carta et al. 2012) * *
Allopregnenolon	neuroprotektivní antidepresivní cytoproliferační	snížené hladiny u pacientů s depresemi a zvýšené u pacientů s panickými atakami (Schule et al. 2014) snížení zánětů a vyvolání neurogeneze u animálního modelu AD (Irwin et al. 2014) * snížené koncentrace intracelulárního vápníku (Frank & Sagratella 2000) *
Progesteron	neuroprotektivní regenerační a promyelinizační pozitivní modulátor GABA receptorů	zvýšené hladiny u pacientů s epilepsií (Hill et al. 2011) zvýšené hladiny u pacientů s panickou poruchou (Brambilla et al. 2003) zvýšené hladiny u pacientů se schizofrenií (Bicikova et al. 2013)
Kortikosteron	anxiolytické stresový hormon	nižší u pacientů s Parkinsonovou chorobou trpící depresemi, než u pacientů pouze s depresemi (Pálhagen et al. 2010) součástí kortikoretikulární pozitivní zpětné vazby (Steriade 2001)



## 2.4 METODY STANOVENÍ

Steroidní hormony se ve srovnání s jinými látkami přítomnými v tělních tekutinách vyskytují ve velmi nízkých koncentracích řádově pmol/L až nmol/L. Výzkum těchto látek je tedy zcela závislý na spolehlivosti a citlivosti metod využívaných pro jejich detekci. V následující části práce budou nastíněny existující analytické metody, které tato kritéria splňují.

### 2.4.1 IMUNOANALYTICKÉ METODY

Imunoanalytické metody jsou založeny na principu specifické interakce mezi protilátkou (Ab) a antigenem (Ag). Vývoj tohoto typu metod je úzce spjat s vývojem specifických derivátů haptenu, které jsou využívány pro imunizaci zvířat při získávání vhodných Ab. Citlivost imunoanalýzy je závislá na vlastnostech Ab a to na jejich schopnosti se vázat a širokém množství přirozených i syntetických Ag, dále pak na jejich specifitě pro reagující látku a na síle vazby (Barnard & Kohen 1990; Yalow & Berson 1959). Při interakci Ab s analytem dochází k vytvoření imunokomplexu, který lze v laboratoři snadno detekovat. U moderních imunoanalytických metod je na Ag nebo Ab navázána specifická látka (indikátor). Indikátorem může být radioaktivní izotop enzym, fluorescenční látka, DNA, koloidní částice aj. viz Tab.2.

*Tab.2 Přehled imunoanalytických metod, rozdělení podle typu indikátoru.*

*(Upraveno podle Doležalová 1995)*

Indikátor	Metoda	Detekce
Radionuklid	Radioimunoanalýza - RIA Immunoradiometrická analýza- IRMA	Měření radioaktivity
Enzym	Enzymoimunoanalýza - EIA	Spektrofotometrie barevného produktu
Fluorescenční látka	Fluorescenční imunoanalýza - FIA	Fluorimetrie
Luminescenční látka	Luminescenční imunoanalýza - LIA	Luminimetrie
Stabilní volné radikály	Technika volných radikálů- FRAT	Elektronová spinová rezonance

Je několik kritérií, podle nichž je možné imunoanalytické metody charakterizovat. První možností je podle základního metodického principu na kompetitivní a nekompetitivní metody, nebo dle nutnosti separace volné a vázané frakce indikátoru na heterogenní a homogenní metody. Při naší práci byla využita radioimunoanalýza, proto ji zde podrobněji popíšeme.

#### **2.4.1.1 RADIOIMUNOANALÝZA**

Radioimunoanalýza (RIA) je velmi citlivá metoda, jejímž základem je imunochemická reakce Ag s Ab v prostředí *in vitro*. Počátky imunoanalýzy se řadí do 2. poloviny 20. stol. V roce 1960 zveřejnili fyzikové Berson a Yalowová studii, ve které popisovali metodu pro stanovení koncentrace inzulinu v plazmě. Bylo to tak poprvé, kdy byla stanovena hladina hormonů v krvi pomocí *in vitro* metody (Berson & Yalow 1959; Lapcik et al. 1999). RIA se velice rychle rozšířila do všech oblastí laboratorní medicíny a stala se významným analyticko-diagnostickým nástrojem. Až v posledních letech dochází k poklesu zájmu a bývá částečně nahrazována neizotopovými imunoanalytickými a jinými metodami. Pro svou vysokou citlivost a i nízkou finanční náročnost si však zachovává jisté uplatnění jak v klinické analýze, tak i ve výzkumu.

U RIA stanovení dochází při optimálních reakčních podmínkách ke kompetitivní reakci značeného Ag\* a neznačeného Ag se specifickou Ab. Specifická Ab je v reakci přítomna v limitovaném množství, které je nedostatečné k tomu, aby bylo možné navázat všechny Ag ve směsi. RIA se řadí mezi kompetitivní heterogenní metody, což vyžaduje separaci volné i vázané frakce analytu. Podíl Ag\* (indikátor) vázaného na Ab je označován jako vázaná frakce a množství nevázaného indikátoru jako volná frakce. Po dosažení rovnováhy se pomocí vhodné separační metody oddělí volný Ag od vázaného Ag a určí se aktivita jedné nebo obou frakcí. Podíl vázané aktivity klesá kvůli konkurenční reakci s rostoucím obsahem neaktivního Ag (L'Hermite & Midgley 1971; Lapcik et al. 1999).

## 2.4.2 CHROMATOGRAFICKÉ METODY

Chromatografie patří mezi základní analytické metody. Jedná se o separační metodu, která je založena na rozdílném rozložení látek mezi dvě nemísitelné fáze a to fází mobilní a stacionární. Stacionární fází se rozumí nejčastěji tuhá látka, která má schopnost různě zadržovat jednotlivé složky analyzované látky. Je umístěna v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Mobilní fáze protéká kolonou přes tento sorbent a dochází tak k separaci na základě fyzikálně-chemických vlastností analyzované látky. Pro účinné rozdělení je u některých směsí vyžadováno zahřátí kolony na vyšší než laboratorní teplotu. Chromatografii můžeme rozdělit podle druhu mobilní fáze na několik typů. V následující části práce se zaměříme na chromatografii plynovou a kapalinovou, jež jsou při výzkumu steroidních hormonů často využívány.

### 2.4.2.1 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

U plynové chromatografie (GC) je jako mobilní fáze používán plyn, do kterého je dávkován vzorek a je pak dále unášen kolonou. Jako nosný plyn se využívá dusík, helium nebo argon. Součástí přístroje je regulační systém, který může měnit průtok nosného plynu. Ideální nastavení zjišťujeme v průběhu optimalizace. Jak již bylo popsáno, v koloně dochází k separaci složek, které po výstupu z kolony dopadají postupně na detektor. Signál z detektoru je následně vyhodnocen a výsledkem je určený druh a kvantitativní zastoupení jednotlivých složek vzorku. S plynovým chromatografem může být spojeno několik druhů detektorů. Mezi tradiční patří např. detekce vychytáváním elektronů (ECD), plamenoionizační detektor (FID) či tepelně vodivostní detektor (TCD), v současnosti nejčastěji používaným typem detekce v GC je hmotnostní spektrometrie. Výhodou je schopnost rozdělení mnohasložkových směsí na jednotlivé látky, možnost analýzy z malého množství vzorku a identifikace analytu na více úrovních (retenční čas, selektivní detektory, dvourozměrná chromatografie). Nevýhodou GC je, že měřená látka musí být těkavá a termicky stabilní. Látky, které jsou netěkavé je potřeba derivatizovat, což vyžaduje větší časovou i finanční náročnost (Nováková & Douša 2013).

#### **2.4.2.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE**

U kapalinové chromatografie (LC) je mobilní fází, jak již název vypovídá, kapalina. Při separaci složek hraje roli nejen jejich samotná interakce, ale také použitá mobilní fáze. Čas, který tráví analyt mezi jednotlivými fázemi, je závislý na afinitě analytu ke každé z nich. Mechanismů separace je několik, např. rozdělování na základě rozpustnosti, iontová výměna, adsorpce nebo specifické interakce pro afinitní chromatografii. Oproti GCMS je možné pracovat za laboratorní teploty, jelikož se vzorek nepřevádí na plyn. LC je tedy vhodná pro separaci netěkavých a teplotně nestálých sloučenin. Pro vyšší účinnost byla v 70. letech 20. stol. vyvinuta vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Vychází jak z klasické kolonové chromatografie, tak z GC. Vysokých účinností je dosaženo použitím malých částic reprezentujících stacionární fázi v koloně. K detekci látek jsou nutné velmi citlivé detektory, které umožňují zpracování signálu z kolony a následný transfer do počítače. V LC se používá několik druhů detektorů a to např. spektrofotometrické (UV-VIS) – absorbance eluátu, refraktometrické – změny indexu lomu eluátu při průchodu měřicí celou, fluorescenční – sekundární (emisní) záření, elektrochemické – proud vznikající při průchodu látky měrnou celou a dnes v první řadě hmotnostní – detekce hmoty po ionizaci iontů. Mezi výhody HPLC patří široká oblast použitelnosti, dále pak možnost ovlivnit složení mobilní fáze a vysoká citlivost. Nevýhodou je oproti GC náročnější instrumentace a složitější mechanismus separace (Nováková & Douša 2013).

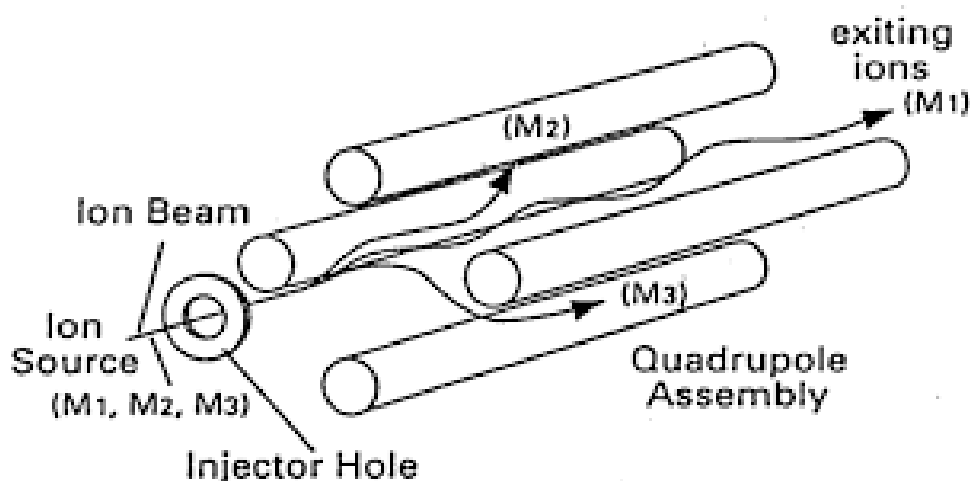
#### **2.4.2.3 KOMBINACE CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ**

Hmotnostní spektrometrie (MS) je vysoce citlivá a efektivní metoda, která se využívá pro potvrzení identity analytu v biologických směsích. Svým způsobem se jedná taktéž o separační metodu, která však využívá k rozdělení látek jiné prostředí než chromatografie. MS je založena na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Každý MS obsahuje tři základní části a to iontový zdroj, analyzátor a detektor. Iontový zdroj pomáhá převést analyt ionizovaného stavu v plynné fázi. Z analytů vstupujících do iontového zdroje tak vznikají kladně nebo záporně nabití ionty, které jsou pak nesený k dalším částem přístroje. Rozlišujeme několik druhů zdrojů, které jsou vhodné pro různé druhy analytů a pro různé analytické techniky. Např. při elektronové ionizaci se využívá energie dopadajících elektronů na analyt a následnou fragmentaci (vznik iontů). Problém při stanovení může být úplný rozpad molekulového iontu ve zdroji. S tímto problémem se lze vypořádat pomocí měkčích ionizačních technik, které využívají například vysoké napětí (elektrosrej - ESI), UV

záření (fotoionizace za atmosférického tlaku) nebo elektrického výboje (chemická ionizace za atmosférického tlaku - APCI). ESI je jednou z nejpoužívanějších ionizačních technik při spojení LC s MS (LCMS). Je vhodná od středně až po velmi polární látky. Rozpuštěný analyt prochází kovovou kapilárou, na které je vysoké napětí (3-5kV). Vznikají elektricky nabitě kapičky, které jsou rozprášeny a ze kterých jsou následně uvolňovány ionty, které putují dál do analyzátoru (Gaskell 1997). Analyzátor je klíčová součást MS. Dochází zde k separaci iontů za vakua na základě poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Byla vyvinuta celá řada analyzátorů, všechny však využívají elektrické, nebo magnetické pole, či jejich kombinaci. Pravděpodobně pro svou relativně nízkou pořizovací cenu a vysokou citlivost je nejvíce rozšířený kvadrupólový analyzátor. Principem jsou čtyři stejné kovové tyče, kdy na dvou protilehlých je přívod střídavého a na druhých dvou stejnosměrného proudu. V okamžiku kdy je ion přiveden do středu osy kvadrupólu začne oscilovat. Určité kombinace nastavení proudů jsou specifické pouze pro ion s určitou hodnotou  $m/z$ . U tohoto iontu je oscilace stabilní a může tak projít celým kvadrupólem až k detektoru. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny mezi tyčemi a odcházejí mimo prostor kvadrupólu. Celý proces je zobrazen na Obr.6.

*Obr.6 Hmotnostní analyzátor – Kvadrupól : průlet iontu skrz kvadrupól*

*(Převzato z [www.holcapek.upce.cz](http://www.holcapek.upce.cz))*



Během minulých let se stala velmi oblíbenou kombinace tří kvadrupólů zapojených za sebou – trojitý kvadrupól. První kvadrupól (Q1) je hmotnostním filtrem, druhý působí jako kolizní cela (Q2) s kolizním plynem a zodpovídá za fragmentaci iontů, které jsou analyzovány třetím kvadrupólem (Q3). Ionty, které jsou analyzátozem vybrány, dopadají na detektor, kde jsou zaznamenány. Výsledný signál je následně převeden do digitálního formátu, který můžeme pomocí softwaru vyhodnotit (March et al. 1989).

V průběhu let došlo k propojení MS s chromatografickými technikami (GCMS a LCMS). Byla tak získána kvalitní separace analytů a jejich spolehlivá detekce. Výhodou těchto technik je schopnost poskytnout celé hmotové spektrum i z několika pmol analytu a může tak být stanoveno např. celé steroidní spektrum. GCMS byla první instrumentální metodou, kterou byly steroidy detekovány a to v 60. letech 20. stol. GCMS hraje klíčovou roli při metabolickém profilování. V oblasti medicíny je metabolomika používána zejména k nalezení biomarkerů jakožto indikátorů různých onemocnění, či při hodnocení celkového stavu lidského těla (Dunn & Ellis 2005). Tímto způsobem se stanovují steroidy po celém světě a napomáhají celkovému zlepšení diagnostiky u celé řady onemocnění (Hähnel et al. 1985; Silberzahn et al. 1985; Kancheva, M. Hill, et al. 2011; Vitkin et al. 2014; Dušková et al. 2015; Hill et al. 2016b).

Díky neustálému vylepšování přístrojů získává LCMS čím dál větší analytické možnosti a specifitu potřebnou pro spolehlivé stanovení steroidů. LCMS analýza biologických materiálů zlepšuje přesnost diagnostiky a to i díky možnosti vyhotovení steroidního profilu u analyzované látky. Pomocí této techniky byly měřeny steroidní hormony nejen v plazmě (Burt et al. 2013; Haring et al. 2013; Sosvorova et al. 2015 b; Sosvorova et al. 2015 d), ale také v moči (Lykkesfeldt et al. 1994; Kushnir et al. 2003), ve slinách (Jönsson et al. 2003; Dušková et al. 2016) a CSF (Caruso et al. 2014; Sosvorova et al. 2015 b).

### **3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE**

- 1) Vývoj metodiky pro stanovení vybraných steroidních hormonů v CSF
- 2) Porovnání základní palety neuroaktivních a dalších steroidů u pacientů s normotenzním hydrocefalem (NPH) a zdravého kontrolního souboru (C)
- 3) Rozšíření palety stanovovaných steroidů a porovnání mezi pacienty s NPH a pacienty s negativní reakcí na LDT (LDneg)

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1 ÚČASTNÍCI STUDIE**

Do studie bylo zařazeno 23 pacientů ve věku 65-80 let s podezřením na NPH. U všech byl proveden LDT, po kterém byli pacienti rozděleni do dvou skupin podle toho, jak na test reagovali. Pacienti, u kterých bylo zaznamenáno v průběhu LDT zlepšení, byli indikováni k implantaci shuntu a jsou označováni jako NPH. U pacientů, kteří na LDT nereagovali, nebo nebyla reakce jednoznačná, bylo onemocnění NPH vyloučeno. Tato skupina je označována jako LDneg.

Kontrolní soubor byl tvořen 10 probandy, u kterých byl CSF odebírán z léčebně-diagnostických důvodů. U těchto pacientů nebyly diagnostikovány žádné endokrinopatie ani psychické poruchy. Jednalo se převážně o pacienty s incidentálním aneurysmatem, u nichž se lumbální drenáž provádí během operačního výkonu za účelem relaxace mozku a usnadnění přístupu operátora k aneurysmatu.

### **4.2 SBĚR VZORKŮ**

CSF u pacientů s NPH a LDneg byl odebrán v poloze na boku s ohnutými zády a místním znecitlivěním v oblasti dolní bederní páteře mezi trny L3-S1. Odběry byly provedeny vždy ráno před LDT na oddělení Neurochirurgie v Ústřední vojenské nemocnici v Praze (ÚVN). Odběry CSF u kontrolního souboru probandů byly prováděny v rámci plánovaných operačních výkonů. CSF byl odebírán do plastových zkumavek, následně zmražen a převezen na pracoviště Endokrinologického ústavu v Praze (EÚ) na Oddělení steroidů a proteofaktorů (OSP). Zde byl uložen v mrazáku v  $-79^{\circ}\text{C}$ , až do doby zpracování. Od všech subjektů byl získán v ÚVN informovaný souhlas s použitím biologického materiálu pro výzkumné účely. Protokol odběru byl schválen etickou komisí EÚ a pacienti podepsali informovaný souhlas s využitím biologického materiálu pro vědecké účely.



### 4.3 CHEMIKÁLIE A REAGENCIE

- kortizol, kortizon, DHEA - Koch-Light Laboratories Ltd. (Colnbrook, Great Britain)
- $7\alpha$ -OH-DHEA,  $7\beta$ -OH-DHEA,  $7\alpha$ -oxo-DHEA,  $16\alpha$ -OH-DHEA, kortikosteron, androstendion, pregnenolon, progesteron, 17-OH-pregnenolon a d3-DHEA, d7-androstendion, d4-pregnenolon, d3-17-OH-pregnenolon, d8-kortikosteron, d9-progesteron - Steraloids (Newport, RI, USA)
- d4-Kortizol - CDN isotopes (Ponte-Claire, Canada)
- d1- $7\alpha$ -OH-DHEA, d1- $7\alpha$ -oxo-DHEA – Betulinines (Stříbrná Skalice, Česká republika)
- aldosteron, d7-kortizon, d7-aldosteron, 2-hydrazinopyridin, amonium formát , trifluoroctová kyselina - Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
- $7\beta$ -OH-epiandrosteron, d2- $7\beta$ -OH-epiandrosteron – dar od prof. R. Morfina (CNAM, Paříž, Francie)
- LC-MS metanol a voda pro chromatografii - Merck AG (Darmstadt, Německo)
- fyziologický roztok (0,9%NaCl) – B. Braun (Melsungen AG, Německo)
- Imunoanalytická diagnostická souprava pro stanovení DHEA – Immunotech, Beckman Coulter Company (Marseille, France)
- suchý led, plynný dusík – The Linde Group (Mnichov, Německo)

### 4.4 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

- Vysokorychlostní kapalinový chromatograf s tandemovým hmotnostním detektorem (LCMS/MS)
  - UHPLC (vysokorychlostní kapalinový chromatograf) Eksigent ultra-LC 110 (Redwood City, CA, USA)
  - Hmotnostním spektrofotometr API 3200 - Sciex (Concord, Canada)
  - Chromatografická kolona Kinetex C18 2.6 $\mu$ m (150 x 3 mm) – Phenomenex (Torrance, CA, USA)
  - Security guard ULTRA cartridge systém – UHPLC C18 pro 3 mm kolonu - Phenomenex (Torrance, CA, USA)
  - Generátor dusíku NM20Z - Peak Scientific Instrument Ltd. (Renfrewshire, Skotsko)
- Stratec SR 300 – Stratec Biomedical systems AG (Birkenfeld, Německo)
- Analytické váhy – Mettler-Toledo GmbH (Giesen, Německo)

- Vakuová odparka Heto – Heto-Holten AIS (Allerød, Dánsko)
- Centrifuga stolní PK110 – ALC International s.r.l (Cologno Monzese, Itálie)
- Vodní lázeň s třepáním GFL1083 se zabudovaným teplotním čidlem – Gesellschaft fur Labortechnik mbH (Burgwedel, Německo)
- Termoblok Grant QBD4 – Grant Instruments Ltd. (Cambridge, Velká Británie)
- Ultrazvuková lázeň – Tescon (Pradubice, Česká Republika)
- Safe Aspiration Station – Gilson S.A.S (Villiers le Bel, Francie)
- Vortex – Velp Scientifica (Vellate, Itálie)
- Pipety
  - Mikropipeta automatická nastavitelná ACURA 20-200μl – Socorex Isba S.A. (Ecublens, Švýcarsko)
  - Mikropipeta automatická nastavitelná ACURA 100-1000μl – Socorex Isba S.A. (Ecublens, Švýcarsko)
- Mikrostříkačky Hamilton 5μl, 10μl, 25μl, 50μl, 100μl, 250μl, 500μl – Hamilton (Bonaduz, Švýcarsko)
- Dávkoř Acurex – Socorex Isba SA (Ecublens, Švýcarsko)
- Skleněné odměrné válce a kádinky – SciLabware Ltd. (Staffordshire, Velká Británie)
- Spotřební materiál: špičky, ependorfky, skleněné zkumavky, vialky, skleněné inzerty
- Ovládání systému LCMS/MS a vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno pomocí programu Analyst 1.6 - Sciex (Concord, Canada)
- Zpracování výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Office Excel 2010 – Microsoft Corporation (Redmond, USA) a R-3.2.2 – R Development Core Team (USA)

## 4.5 MĚŘENÉ STEROIDY

Pomocí vyvinuté metodiky na LC-MS/MS bylo stanoveno 14 analytů:

- kortizol, kortizon, pregnenolon, 17-OH-pregnenolon, progesteron, kortikosteron, aldosteron, androstendion, dehydroepiandrosteron (DHEA), 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7 $\alpha$ -DHEA, 16 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-epiandrosteron

Radioimunoanalyticky byl stanoven 1 analyt:

- DHEAS

## 4.6 PŘÍPRAVA VZORKŮ A REAGENCIÍ

### 4.6.1 PŘÍPRAVA ZÁSObNÍCH ROZTOKŮ

Pro každý analyt byly připraveny zásobní roztoky v metanolu o koncentraci 1mg/mL (zásobní roztok). Dále stejným způsobem i pracovní roztoky v metanolu 10 $\mu$ g/mL pro kortizol, kortizon a všechny deuterované interní standardy (IS) a 1 $\mu$ g/mL pro 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7 $\alpha$ -DHEA, 16 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-epiandrosteron, 17-OH-pregnenolon, aldosteron, androstendion, DHEA, kortikosteron, pregnenolon, progesteron. Všechny připravené roztoky byly skladovány v mrazáku při -20°C.

Kalibrační směs v methanolu byla připravena z jednotlivých pracovních roztoků o výsledných koncentracích: kortizol 100ng/mL, kortizon 25ng/mL, 7 $\alpha$ -OH-DHEA 2ng/mL a 1ng/mL u 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7 $\alpha$ -DHEA, 16 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-epiandrosteron, 17-OH-pregnenolon, aldosteron, androstendion, DHEA, kortikosteron, pregnenolon, progesteron. Koncentrace jednotlivých analytů v kalibrační směsi vycházely ze známých, či očekávaných koncentrací jednotlivých steroidů v CSF. Obdobným způsobem byla připravena směs IS v methanolu s finální koncentrací 150ng/mL d4-kortizol, 100ng/mL d7-kortizon, 25ng/mL d7-androstendion, 20ng/mL d7-aldosteron, d1-7-OH-DHEA, d2-7 $\beta$ -OH-epiandrosteron, 15ng/mL d9-progesteron, 10ng/mL d3-DHEA, d8-kortikosteron, d3-17-OH-pregnenolon, 5ng/mL d4-pregnenolon. Směsi byly uloženy v mrazáku při -20°C. Koncentrace IS byly připraveny tak, aby výsledné intenzity chromatografických píků u jednotlivých měřených analytů byly podobné intenzitám IS. Koncentrace byly určeny na základě porovnávání měření intenzit jednotlivých analytů o různých koncentracích.

Osmi-bodová kalibrační křivka byla v rozmezí 0,801-100ng/mL pro kortizol, 0,200-25ng/mL pro kortizon, 0,016-2ng/mL pro 7 $\alpha$ -OH-DHEA a 0,008-1ng/mL pro 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA, 16 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-epiandrosteron, 17-OH-pregnenolon, aldosteron, androstendion, DHEA, kortikosteron, pregnenolon, progesteron.

#### 4.6.2 PŘÍPRAVA 5mM AMONIUM FORMÁTU V 60% METHANOLU

Při přípravě 5mM amonium formátu byl nejprve připraven roztok 60% methanolu, kdy 60mL methanolu bylo doplněno 40mL vody pro chromatografii. Dále bylo naváženo přibližně 30mg amonium formátu a doplněno ekvivalentním množstvím 60% methanolu. Roztok byl zamíchán a skladován v lednici při 4°C.

#### 4.6.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO LCMS/MS ANALÝZU

Do skleněných zkumavek bylo Hamiltonovou stříkačkou injikováno 10 $\mu$ L směsi IS. Po odpaření ve vakuové odparce (35min) byly do zkumavek napipetovány 3mL CSF, naředěny 1mL fyziologického roztoku a obsah zkumavek byl promíchán na vortexu. Následně byl obsah extrahován po dobu 1min 4mL diethyletheru. Po zmrazení vodné fáze (zbytkový CSF) byla etherová fáze slita do čisté zkumavky a odpařena při 37°C ve vodní lázni. Následná derivatizace byla provedena metodou podle Higashiho (Higashi et al. 2007). K odparkům bylo přidáno 100 $\mu$ L derivatizační směsi obsahující 2-hydrazinopyridin, methanol a kyselinu trifluoroctovou (1mg: 5mL: 1,63 $\mu$ L). Po promíchání a následné inkubaci 15min v ultrazvukové lázni byl obsah odfoukán proudem dusíku. Sraženina byla rozpuštěna 100 $\mu$ L roztoku 5mM amonium formátu s 60% methanolem a stočena (2000g, 5min, 22°C). Výsledný roztok byl převeden do vialek s inzerty a analyzován pomocí LCMS/MS. Data byla zpracována pomocí programu Analyst 1.6, kde byly analyty kvantifikovány na základě kalibračních křivek se známými koncentracemi analytů a IS.

Ke každému měření byla připravena osmi-bodová kalibrační křivka. Kalibrace, nula (pouze IS) a blank (bez IS) byly zpracovány v dubletu a společně s kontrolními vzorky zpracovány stejným způsobem. CSF byl vzhledem k podobnému matricovému efektu u kalibrace nahrazen fyziologickým roztokem (Sosvorova et al. 2015 b).

#### 4.6.4 PŘÍPRAVA PRO VALIDACI

Pro validaci metody byla připravena kalibrační křivka v duplikátu, kontrolní slité CSF a vzorky s přídávky. Do všech zkumavek bylo pomocí Hamiltonovy stříkačky nadávkováno 10 $\mu$ L směsi s IS a do zkumavek pro kalibraci byl podle tabulky (Tab.3) stejným způsobem převeden příslušný objem kalibrační směsi. Do zkumavek pro přídávky bylo nahamiltonkováno podle Tab.3 příslušné množství kalibrační směsi, pracovalo se ve čtyřplikátech. Obsah zkumavek byl odpařen na vakuové odparce (35min) a dále se vzorky zpracovaly stejným způsobem, jaký byl popsán v odstavci 4.6.3. Vzorky byly vyhodnoceny pomocí programu Analyst 1.6 a výsledné koncentrace byly zpracovány pomocí tabulky v programu Microsoft Excel 2010.

*Tab.3 Objemy kalibrační směsi pro kalibrační křivku (KLB0-KLB8) a standardní přídávky ( $\mu$ L)*

Body kalibrační křivky	Objem ( $\mu$ L)
KLB8	750
KLB7	375
KLB6	190
KLB5	95
KLB4	50
KLB3	25
KLB2	12
KLB1	6
KLB0	0
<b>Standardní přídávky</b>	
I a, b, c, d	0
II a, b, c, d	20
III a, b, c, d	80

#### 4.6.5 PODMÍNKY PŘI MĚŘENÍ LCMS/MS

Vzorky byly analyzovány pomocí UHPLC s tandemově zapojeným MS s trojitým kvadrupólem. Chromatografická separace proběhla na koloně Kinetex C18 2.6 $\mu$ m, která byla zapojena za odpovídajícím security guardem. Kolony Kinetex využívají technologii “core-shell” - částice s pevným jádrem, které je obklopeno porézním silikagelem. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,75mL/min při 50°C. Mobilní fáze byla tvořena vodou (solvent A) a metanolem (solvent B). Byl použita gradientová eluce, která probíhala lineárně následujícím

způsobem: 0min, 50:50 (A:B); 2min, 50:50; 4min, 25:75; 7min, 5:95; 8min 30s, 5:95; 9min, 50:50; 10min, 50:50 a v 10min konec. Jednotlivé rozseparované analyty po výstupu z chromatografické kolony prochází kapilárou, na které je vysoké napětí (3-5kV). Při měření bylo využito ESI, kdy hmotnostní detektor pracoval v pozitivním módu. Podmínky vhodné pro optimální chod iontového zdroje a MS/MS systému byly nastaveny servisním technikem při pravidelné prohlídce přístroje. Podmínky byly následující: curtain gas: 25psi (172,38kPa), ion spray voltage: 5,5kV, teplota: 600°C, kolizní plyn (dusík): 4psi (25,58kPa), ion source gas1: 40psi (275,79kPa), ion source gas2: 60psi (413,69kPa).

#### 4.6.6 PŘÍPRAVA PRO RIA ANALÝZU

DHEAS byl stanovován radioimunoanalyticky a to komerčně dostupnou diagnostickou soupravou (kit) pro stanovení DHEA. Pracovalo se se zbytkovým CSF, který byl vytvořen během přípravy vzorků pro LCMS/MS a to po extrakčním kroku. V tomto kroku byl nekonjugovaný DHEA vyextrahován do etherové fáze a ve vodné fázi zůstal DHEAS. Koncentrace DHEAS v krvi je řádově vyšší než v CSF (krev -  $\mu\text{mol/L}$ , CSF –  $\text{nmol/L}$ ). Hladiny DHEA v krvi se pohybují v řádech  $\text{nmol/L}$ , proto takto nízké hladiny je DHEA kit tedy dostatečně citlivý. Antisérum použité v kitové soupravě pro stanovení DHEA zkříženě reagovalo s DHEAS přibližně v 30% a analýza byla tudíž dostatečně citlivá na detekci DHEAS v CSF. Do kitových zkumavek, potažených protilátkou, bylo přidáno 100 $\mu\text{L}$  zbytkového CSF ze vzorků. Do zkumavek připravených pro kalibraci bylo přidáno 100 $\mu\text{L}$  příslušného kitového kalibrátoru. Jako kontrola byl použit směsný CSF po extrakci. Kalibrace a kontrola byly zpracovány v dubletu, vzorky v monoplíkatu. Do všech zkumavek bylo přidáno 500 $\mu\text{L}$  radioindikátoru a promícháno na vortexu (1200 otáček). Současně bylo převedeno 500 $\mu\text{L}$  radioindikátoru do 2 nepotažených plastových zkumavek pro zjištění celkového počtu impulzů (TOTAL). Všechny zkumavky byly zakryty a inkubovány 60min při 37°C ve vodní lázni. Poté byl odsát obsah každé zkumavky (vyjma zkumavek na TOTAL) a navázaná aktivita byla změřena gama-čítačem (Stratec SR 300). Na počítači byla sestrojena kalibrační křivka, ze které se odečetly výsledné koncentrace ve vzorcích.

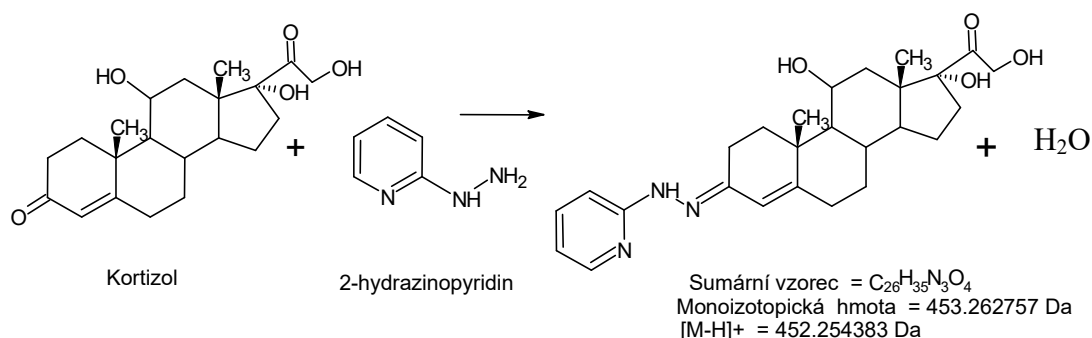
## 4.7 VÝVOJ METODIKY LCMS/MS

Pro stanovení analytů v CSF byla vyvinuta nová metoda s využitím LCMS/MS. Tato metoda byla nejprve optimalizována a následně validována podle parametrů Guidance for Industry - Bioanalytical method validation (Food and Drug Administration, 2001).

### 4.7.1 DERIVATIZACE

Derivatizace je cílenou chemickou reakcí vhodnou pro určitý typ sloučenin. Využívá se především pro zlepšení chromatografických podmínek u polárních analytů, kdy je derivatizačním činidlem zablokovaná jejich polární funkční skupina (Higashi et al. 2007). Výsledná molekula má po navázání derivatizačního činidla větší molekulovou hmotnost a je tak lépe detekovatelná. Jako derivatizační činidlo byl použit 2-hydrazino pyridin, který je vzhledem ke svým vlastnostem vhodný pro detekci steroidů s oxo skupinou v postranním řetězci. Na Obr.7 je znázorněn průběh chemické reakce. Derivatizace byla v této metodě použita z důvodu zvýšení citlivosti, kdy bylo dosaženo snížení meze detekce a mohly tak být změřeny analyty i ve velmi nízkých koncentracích (nmol/L–mol/L).

Obr.7 Chemická reakce derivatizace (navázání 2-hydrazinopyridinu na keto skupinu v poloze 3 u kortizolu)



#### 4.7.2 OPTIMALIZACE A VALIDACE

Na počátku vývoje metodiky je potřeba vyladit podmínky samotného měření. K tomu slouží optimalizace metody. Parametry sledované při procesu měření jsou: mobilní fáze, selektivita, retenční čas, šířka píku, rozlišení, průtok, teplota pro separaci a celková doba analýzy. Dále je třeba optimalizovat nastavení hmotnostního spektrometru pro měření jednotlivých analytů. Optimalizace probíhá automaticky za použití kontinuální infuze standardního roztoku derivatizovaného analytu. Software automaticky vyhodnotí optimální podmínky, které vedou k získání co nejvyšší odezvy detektoru. Optimální parametry nastavení detektoru, stejně jako prekurzorový, kvantifikační a konfirmační ionty a retenční časy jsou shrnuty v Tab.6 a 7.

Validace je potvrzení platnosti prostřednictvím objektivních důkazů. Objektivní důkaz je v tomto případě informace, jejíž pravdivost může být prokázána pozorováním, měřením, zkoušením nebo jinými prostředky. Pomocí validace se ujišťujeme, zda je analytický postup vhodný pro zamýšlené měření. Chování metody se charakterizuje pomocí analytických pojmů: preciznost, citlivost, mez detekce, mez stanovitelnosti, linearita a výtěžnost. Charakteristiky metody jsou zjišťovány sérií experimentů a následným statistickým vyhodnocením získaných dat. Námi vyvinutá metoda byla validována ve dvou opakováních. Aby bylo sníženo riziko vzniku chyby při kvantitativní analýze, byla využita při validaci metoda přídavku standardu. Principem metody přídavků je využití známého množství přídavku té samé látky, kterou chceme v neznámém vzorku stanovit. Přídavek je přidán k vzorku tekutiny, ve které je látka analyzovaná, v této práci byl použit směsný vzorek CSF.

#### 4.7.3 CHARAKTERISTIKY METODY

##### MATRICOVÝ EFEKT a IS

Matricové efekty (ME) mohou ovlivnit jak kvalitu, tak i kvantitu analýzy a jsou jedny z mnoha příčin výskytu chyb v kapalinové chromatografii. Zdroje ME mohou být jak exogenní (látky používané během analýzy), tak i endogenní (biologická matrice). Testování je nezbytné pro úspěšnou validaci metody a eliminaci ME lze provést v průběhu celého procesu zpracování vzorku na různých úrovních.

Pro zmírnění ME je např. využívána čistá směs IS. IS je látka, která se ve stanovovaném vzorku přirozeně nevyskytuje, ale je lokalizovatelná v blízkosti chromatografické zóny analytu. Jako IS byly použity deuterované standardy jednotlivých analytů, které se



v biologických materiálech logicky nevyskytují a mají retenční čas téměř totožný s analyzovaným steroidem. IS byly přidány jak do kalibrace tak do vzorku ve stejných koncentracích. Při vyhodnocování se pak poměruje plocha analytu a plocha IS.

#### PRECIZNOST (Precision)

Preciznost je vyjádření, jak těsná je shoda mezi nezávislými výsledky zkoušek získanými za předem definovaných podmínek. Je závislá na rozdělení náhodných chyb a není vztažena ke skutečné hodnotě. Většinou je určena jako rozdíl, standardní odchylka nebo směrodatná odchylka při sérii měření. Parametry preciznosti jsou opakovatelnost a reprodukovatelnost. OPAKOVATELNOST (Intraassay) je definována jako těsnost shody výsledků získaných stejným způsobem, kdy se nesmí změnit, materiál, postup, pracovník, přístroje ani podmínky, proto je potřeba pracovat ve velmi krátkém časovém rozmezí. REPRODUKOVATELNOST (Interassay), což je těsnost shody výsledků měření získaných stejnou metodou a postupy, ale mohou být různé přístroje a pomůcky, pracovník, doba zpracování vzorku aj. Intraassay a Interassay byly vyjádřeny jako relativní standardní odchylka (RSD), jejíž hodnota by neměla přesáhnout 15% (Dolezalova et al. 1995)

#### CITLIVOST (Sensitivity)

Míra schopnosti metody rozlišit dva vzorky. Její hodnota je rovna směrnici kalibrační přímky. Není-li kalibrační závislost lineární, mění se citlivost s koncentrací analytu. Jejími koeficienty je MEZ DETEKCE (LOD) a MEZ STANOVITELNOSTI (LOQ). LOD je nejnížší koncentrace analytu ve vzorku, kterou jsme schopni detekovat, ale kterou nelze kvantifikovat jako exaktní hodnotu. Konkrétně jde o hodnotu, kdy je signál analytu významně odlišný od šumu. LOQ je nejnížší koncentrace analytu ve vzorku, kterou jsme schopni kvantifikovat jako exaktní hodnotu se stanovenou přesností. LOD a LOQ byly definovány podle Tavernierse jako koncentrace, kdy poměr signál ku šumu byl 3 (LOD) a 10 (LOQ) (Taverniers et al. 2004). Signál analytu byl porovnáván se signálem z nulového vzorku.

#### VÝTĚŽNOST (Recovery)

Výtěžnost pro jednotlivé analyty byla vypočítána z analýzy vzorku nejprve bez přídavku a poté vzorku se známým přídavkem stanovované látky. Vyhodnocuje se, kolik známého přídavku bylo detekováno. Čím víc se výtěžnost blíží 100%, tím je metoda lépe optimalizovaná. Výtěžnost byla spočítána jako  $[(\text{koncentrace vzorku s přídavkem} - \text{koncentrace vzorku bez přídavku}) / \text{množství přídavku}] * 100\%$ .

## LINEARITA

Linearita je definována jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými a to mezi analytickým signálem a koncentrací analytu. Je charakterizována metodou lineární regrese pomocí korelačního koeficientu ( $r$ ). Ten charakterizuje těsnost naměřených bodů k proložené křivce. Čím více se hodnoty  $r$  blíží jedné, tím je závislost obou proměnných více lineární.

### 4.8 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

Naměřená data byla statisticky zpracována pomocí programu R-3.2.2 a Microsoft Office Excel 2010. Na datech byl nejprve proveden Dean-Dixonův test a byly vyloučeny odlehlé hodnoty s hladinou pravděpodobnosti 95%. Dále jsme ověřovali normální rozdělení dat pomocí Shapiro-Wilkova testu. Nulovou hypotézu jsme zamítali na 5% hladině významnosti ( $\alpha < 0,05$ ). K porovnání jednotlivých skupin jsme u analytů, kde bylo normální rozdělení, zvolili Studentův  $t$ -test a to konkrétně dvouvýběrový nepárový  $t$ -test. U analytů s nenormálním rozdělením dat byl použit nepárový Mann-Whitneyův test. Pro určení statistické významnosti byla zvolena hladina významnosti 5% ( $p < 0,05$ ).

## **5. VÝSLEDKY**

### **5.1 CÍL 1 - VÝVOJ METODIKY PRO STANOVENÍ VYBRANÝCH STEROIDNÍCH HORMONŮ V CSF**

Prvním cílem diplomové práce bylo vyvinutí a validace instrumentální metodiky využívající kapaličkovou chromatografii s hmotnostní detekcí (LCMS/MS), pomocí které by mohlo být v CSF stanoveno vybrané spektrum steroidních hormonů. Měřeny byly hladiny DHEA, 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7 $\alpha$ -oxo-DHEA, 16 $\alpha$ -OH-DHEA, kortizolu, kortizonu a aldosteronu. Autorka diplomové práce má dílčí podíl na vývoji metodiky. Výsledky optimalizace a validace jsou shrnuty v metodickém článku (Sosvorova et al. 2015 a), jenž je součástí přílohy A.

### **5.2 CÍL 2 – POROVNÁNÍ ZÁKLADNÍ PALETY NEUROAKTIVNÍCH A DALŠÍCH STEROIDŮ U PACIENTŮ S NPH A ZDRAVÉHO KONTROLNÍHO SOUBORU**

Druhým cílem diplomové práce bylo stanovení a následné porovnání užšího spektra steroidních hormonů u pacientů s NPH a kontrolního souboru (C). Vyvinutou LCMS/MS metodou byly změřeny hladiny DHEA, jeho 7-oxygenovaných metabolitů, 16 $\alpha$ -OH-DHEA, kortizolu, kortizonu a aldosteronu v CSF u výše zmíněných skupin. Nad rámec metody byly v CSF radioimunoanalyticky stanoveny hladiny DHEAS. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab.4. U 16 $\alpha$ -OH-DHEA byly koncentrace na hranici nebo pod hranicí LOD. Hladiny analytů v CSF u obou skupin probandů byly statisticky zpracovány a výsledky jsou souhrnně znázorněny v Tab.5 a graficky na Obr.7-14. Grafy znázorňují průměrné hodnoty a 95% interval spolehlivosti. Nejvýraznější rozdíl byl zjištěn u aldosteronu, kdy u pacientů s NPH byly hladiny mnohonásobně vyšší než u C ( $p<0,001$ ). Statisticky významně se také lišily hladiny kortizonu. U pacientů s NPH byly naměřené hodnoty nižší než u C ( $p=0,027$ ). Na pomezí statistické významnosti byly vyhodnoceny hladiny u kortizolu ( $p=0,060$ ). U DHEA a jeho 7-oxygenovaných metabolitů nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami probandů.

*Tab.4 Hladiny stanovovaných analytů v CSF - průměr a 95% intervaly spolehlivosti (nmol/L);*

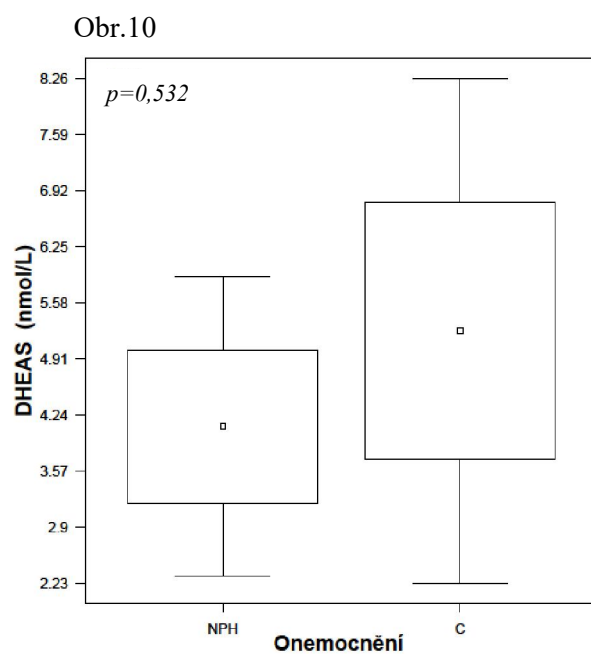
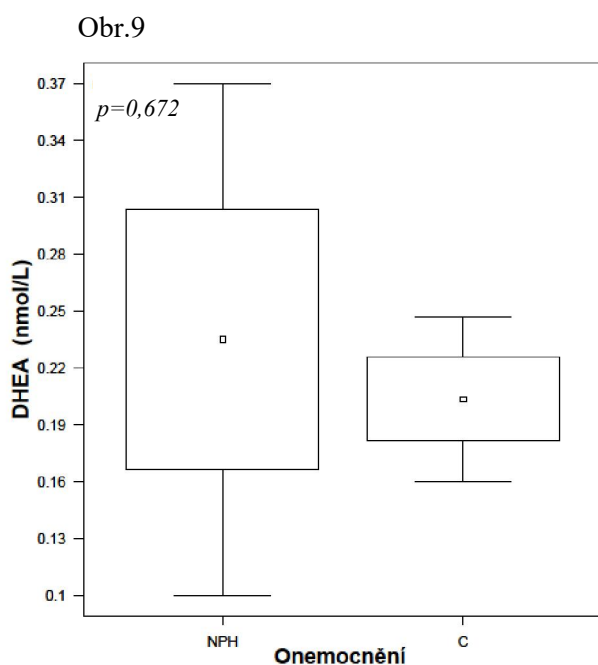
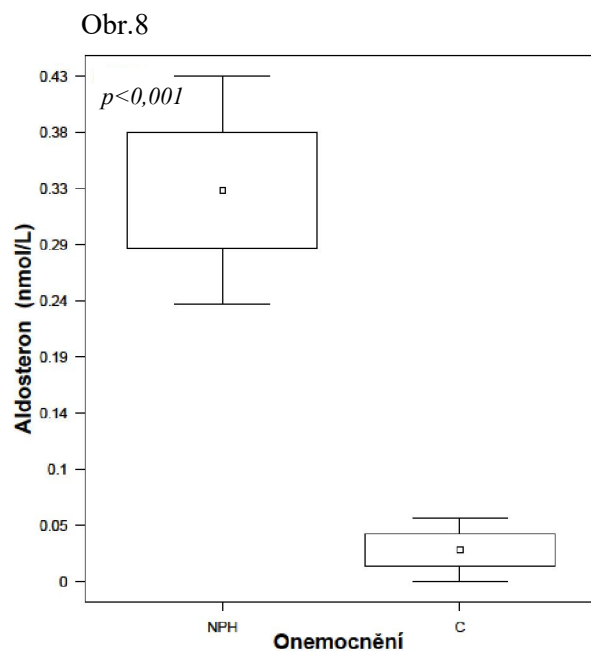
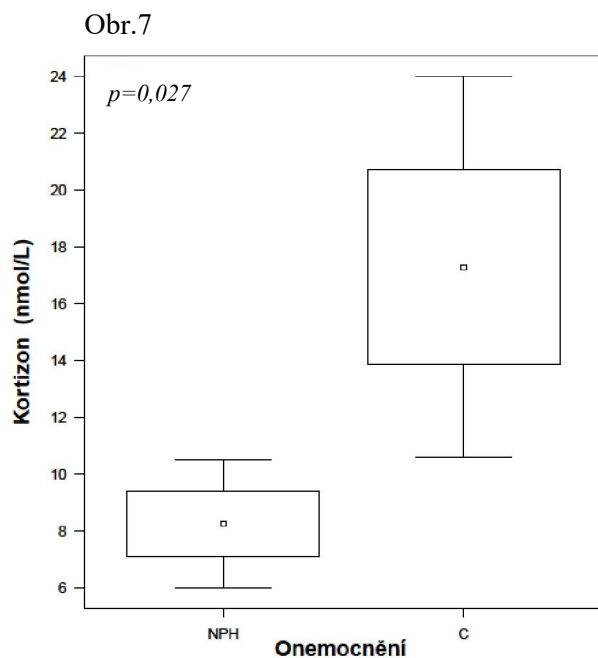
*NPH - pacienti s normotenzním hydrocefalem, C - zdravý kontrolní soubor*

Analyt (nmol/L)	NPH	C
DHEA	0,235 (0,07;0,137)	0,203 (0,022;0,044)
Kortizol	13,364 (2,13;4,175)	82,317 (32,495;63,691)
Kortizon	12,001 (1,877;3,679)	17,048 (3,384;6,632)
7 $\alpha$ -OH-DHEA	0,498 (0,13;0,254)	0,601 (0,091;0,178)
7 $\beta$ -OH-DHEA	0,132 (0,02;0,04)	0,161 (0,024;0,048)
7-oxo-DHEA	0,036 (0,013;0,025)	0,043 (0,009;0,017)
Aldosteron	0,332 (0,049;0,096)	0,028 (0,014;0,027)
DHEAS	4,104 (0,914;1791)	5,245 (1,537;3,013)

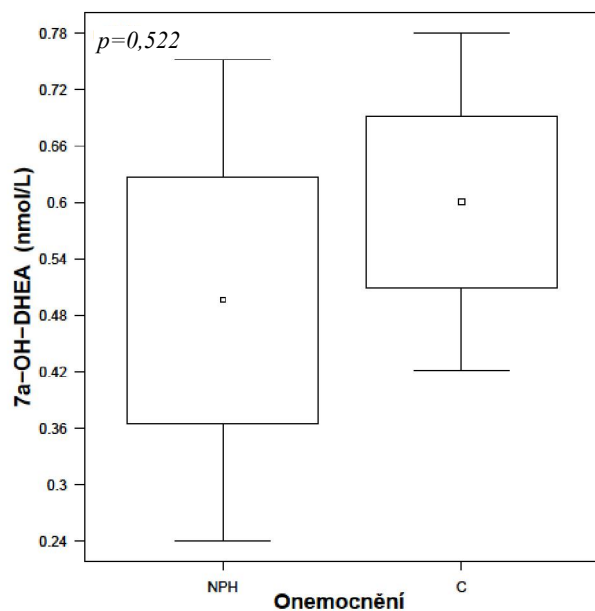
*Tab.5 Hodnoty parametru statistické významnosti (p)*

Analyt	<i>p</i>
DHEA	0,672
Kortizol	0,063
Kortizon	0,027
7 $\alpha$ -OH-DHEA	0,522
7 $\beta$ -OH-DHEA	0,363
7-oxo-DHEA	0,915
Aldosteron	<0.001
DHEAS	0,532

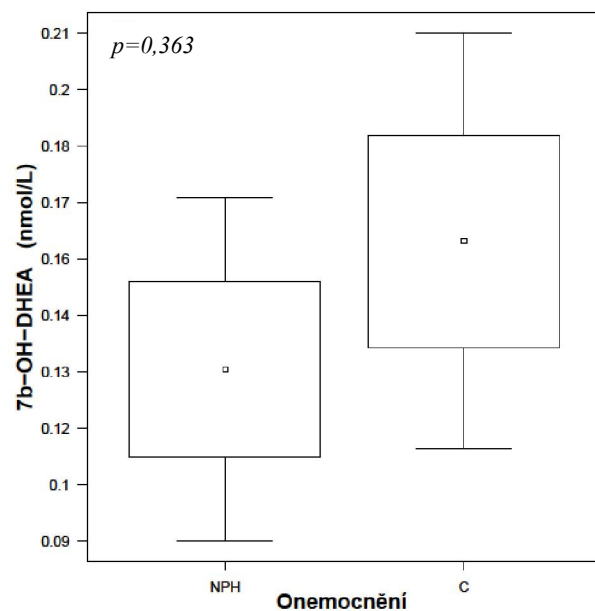
Obr.7-14 Hladiny jednotlivých steroidů v CSF u pacientů s NPH a zdravého kontrolního souboru (C). Grafy (Box-plot) ukazují průměr a 95% intervaly spolehlivosti. Parametr statistické významnosti ( $p$ ) je zobrazen nad jednotlivými grafy.



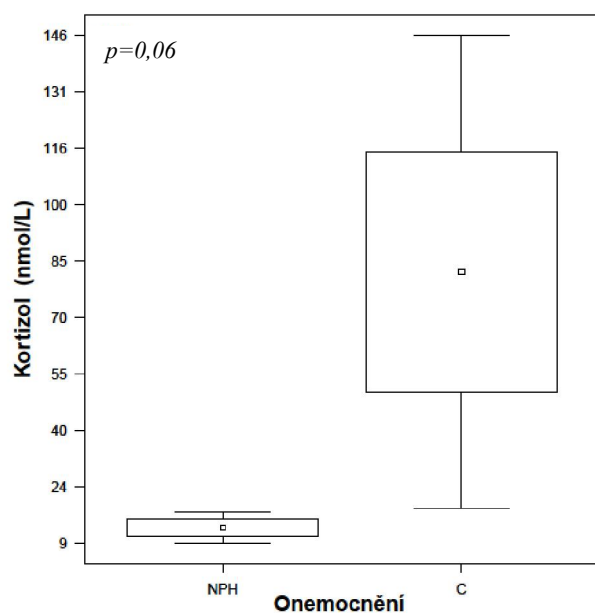
Obr.11



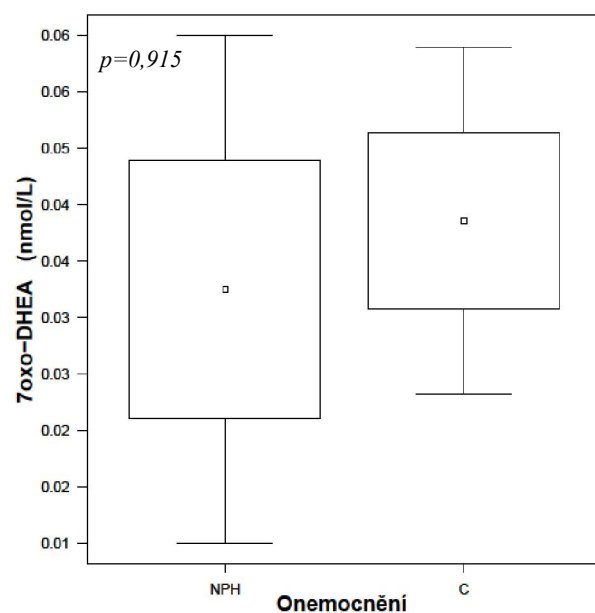
Obr.12



Obr.13



Obr.14



### **5.3 CÍL 3 - ROZŠÍŘENÍ PALETY STANOVOVANÝCH STEROIDŮ A POROVNÁNÍ JEJICH HLADIN U PACIENTŮ S NPH A PACIENTŮ S LDneg**

Vzhledem k nálezu rozdílných hladin sledovaných steroidů u pacientů s NPH a u kontrolní skupiny, byla stávající metoda rozšířena o další analyty a to konkrétně o pregnenolon, 17-OH-pregnenolon, progesteron, kortikosteron, androstendion a 7 $\beta$ -OH-epiandrosteron. Při rozšíření stávající metodiky bylo třeba optimalizovat podmínky MS detekce, dále pak zjistit u jednotlivých analytů hodnoty prekurzorových iontů, fragmentaci iontů a retenční čas. Konečné výsledky jsou shrnuty v Tab.6 a Tab.7. U rozšířené metody pro měření vzorků CSF, bylo potřeba ověřit její validitu. Validace proběhla ve dvou sériích s využitím dvou standardních přídavek kalibrační směsi. Objemy přídavek a výsledné koncentrace jednotlivých analytů jsou zaznamenány v Tab.8. Přídavky byly měřeny vždy ve čtyřplikátu. Z výsledných hodnot byly vypočítány validační parametry pro analýzu CSF, které jsou shrnuty v Tab.9 a Tab.10. Linearita metody byla testována v rozsahu koncentrací 0,008-100ng/mL podle příslušného steroidu a vyjádřena korelačním koeficientem ( $r$ ). Hodnoty jsou společně s kalibračním rozmezím shrnuty v Tab.9. Hodnoty  $r$  byly vyhovující pro všechny steroidy a to v rozsahu 0,9988-0,9999. U všech analytů byla změřena vyhovující výtěžnost a to mezi 83,07-115,3% a hodnoty preciznosti nepřesáhly 15%. Pro jednotlivé analyty byly stanoveny meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) pro měření v CSF. LOD nabývá hodnot 2-73pg/mL a LOQ 6-243pg/mL. Hodnoty pro jednotlivé analyty jsou zaznamenány v Tab.9.

Tab.6 Parametry optimalizace pro stanovované steroidy: retenční čas, prekurzorový ion, kvantifikační ion, konfirmační ion a hodnoty nastavení MS (declustering potencial, DP; entrance potencial, EP; collision entrance potencial, CEP; collision energy, CE; collision cell exit potencial, CXP)

Analyt	Retenční čas (min)	Prekurzorový ion	Kvantifikační ion	Konfirmační ion	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
DHEA	5,16	380,3	159	105,2	66	5	20	43	4
Kortizol	3,89	454,3	120	108,0	81	8,5	20	73	4
Kortizon	5,49	452,3	121	106,1	71	6,5	22	51	4
7 $\alpha$ -OH-DHEA	3,74	396,3	134	105,2	66	11	20	45	4
7 $\beta$ -OH-DHEA	3,48	396,3	148	148,1	76	8	22	41	4
7-oxo-DHEA	3,51	394,3	131	131,2	71	8	18	51	4
16 $\alpha$ -OH-DHEA	4,55	396,3	378	105,2	56	7,5	20	29	32
Aldosteron	3,78	466,3	120	128,0	81	8,5	22	69	4
Progesteron	7,96	497,4	348,1	134,1	66	5,5	24	49	30
Pregnenolon	6,05	408,3	300,2	145,1	56	6	22	37	6
17-OH-Pregnenolon	4,91	424,3	406,2	253,2	46	5,5	22	25	34
Kortikosteron	6,35	529,4	405,1	120,1	71	6	24	41	34
Androstendion	7,14	469,3	322,2	120,2	66	8	24	41	26
7 $\beta$ -OH-Epiandrosteron	3,54	398,3	105,1	108,1	61	7	18	75	4



*Tab.7 Parametry optimalizace pro deuterované steroidy: retenční čas, prekursorový ion, kvantifikační ion, konfirmační ion a hodnoty pro MS (declustering potencial, DP; entrance potencial, EP; collision entrance potencial, CEP; collision energy, CE; collision cell exit potencial, CXP)*

Analyt	Retenční čas (min)	Prekursorový ion	Kvantifikační ion	Konfirmační ion	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
d3-DHEA	5,2	383,4	162	108,1	66	10	16	43	4
d4-Kortisol	3,97	458,3	120	121,2	91	7	22	71	4
d7-Kortison	5,53	551,3	386	126,2	76	6	24	47	32
d1-7 $\alpha$ -OH-DHEA	3,87	397,2	134	105,1	61	7	20	43	4
d1-7oxo-OH-DHEA	3,63	395,2	105	148,1	61	8	20	63	4
d7-Aldosteron	3,84	474,2	124	123,2	71	6	22	75	4
d9-Progesteron	8,13	506,3	354	137,1	71	6	22	53	30
d4-Pregnenolon	6,05	412,3	304	147,1	56	6	20	39	26
d3-17-OH-Pregnenolon	4,92	427,3	409	157,2	46	7	20	27	36
d8-Kortikosteron	6,38	537,3	411	109,2	71	6	24	41	36
d7-Androstendion	7,1	476,3	327	135,1	66	8	22	41	28
d2-7 $\beta$ -OH-Epiandrosteron	3,67	400,3	108	105,2	66	7	20	41	4

Tab.8 Validace – Objemy přidavků kalibrační směsi (μL) a jejich přepočet na koncentraci standardu v roztoku (ng/mL)

Analyt	Standardní přídavek (μL)	Předpokládaná koncentrace (ng/mL)
DHEA	0 20 80	0 0,027 0,107
7β-OH-DHEA		
7-oxo-DHEA		
16α-OH-DHEA		
Aldosteron		
Progesteron		
Pregnenolon		
17-OH-Pregnenolon		
Kortikosteron		
Androstendion		
7β-OH-Epiandrosteron		
7α-OH-DHEA	0 20 80	0 0,053 0,213
Kortizon	0 20 80	0 0,067 2,67
Kortizol	0 20 80	0 2,67 10,67

Tab.9 Shrnutí kalibračních rozmezí, korelačních koeficientů ( $r$ ), mezí detekce (LOD)(pg/mL) a mezi stanovitelnosti (LOQ)(pg/mL) pro jednotlivé analyty v CSF

Analyt	Rozmezí kalibrace (ng/mL)	$r$	LOD (pg/mL)	LOQ (pg/mL)
DHEA	0,008-1	0,9996	4	12
7α-OH-DHEA	0,016-2	0,9990	12	40
7β-OH-DHEA	0,008-1	0,9996	2	6
7-oxo-DHEA	0,008-1	0,9992	12	40
16α-OH-DHEA	0,008-1	0,9990	5	16
Kortizol	0,801-100	0,9995	28	94
Kortizon	0,2-25	0,9989	9	30
Aldosteron	0,008-1	0,9994	9	30
Pregnenolon	0,008-1	0,9992	8	27
Progesteron	0,008-1	0,9988	5	17
17-OH-Pregnenolon	0,008-1	0,9997	7	24
Kortikosteron	0,008-1	0,9991	73	243
Androstendion	0,008-1	0,9991	10	34
7β-OH-Epiandrosteron	0,008-1	0,9993	4	14

Tab.10 Shrnutí validačních parametrů pro jednotlivé analyty v CSF;

preciznost (intraassay, interassay – (%)) a výtěžnost (%)

Analyt	Přídavek (ng/mL)	Preciznost (%)		Výtěžnost (%)
		Intraassay	Interassay	
DHEA	0	6,11	11,85	98,18 103,3
	0,027	2,53		
	0,107	8,4		
Kortizol	0	5,1	8,42	83,07 92,37
	2,67	1,57		
	10,67	1,86		
Kortizon	0	2	12,15	85,88 99,94
	0,67	6,22		
	2,67	3,34		
7 $\alpha$ -OH-DHEA	0	8,04	12,49	90,47 100,55
	0,053	7,29		
	0,213	6,92		
7 $\beta$ -OH-DHEA	0	9,95	3,98	99,87 98,37
	0,027	3,03		
	0,107	5,44		
7-oxo-DHEA	0	4,98	10,97	89,77 95,07
	0,027	12,98		
	0,107	1,39		
Aldosteron	0	2,57	4,44	106,09 99,18
	0,027	3,72		
	0,107	2,03		
Progesteron	0	12,38	14,15	103,11 99,07
	0,027	6,8		
	0,107	4,84		
Pregnenolon	0	3,31	13,69	89,37 97,88
	0,027	7,9		
	0,107	6,41		
17-OH-Pregnenolon	0	10,18	11,5	113,37 100,15
	0,027	5,59		
	0,107	6,31		
Kortikosteron	0	3,6	4,08	104,09 86,49
	0,027	4,18		
	0,107	1,7		
Androstendion	0	6,82	5,37	84,4 93,99
	0,027	4,32		
	0,107	9,78		
7 $\beta$ -OH-Epiandrosteron	0	11,71	3,56	95,56 98,91
	0,027	3,94		
	0,107	4,19		

Nově rozšířenou a validovanou metodou byly stanoveny hladiny steroidů v CSF pacientů s NPH a pacientů s LDneg. Koncentrace 16 $\alpha$ -OH-DHEA byly na hranici nebo pod hranicí LOD. Naměřené hodnoty (Tab.11) byly statisticky zpracovány a skupiny probandů vzájemně porovnány. Parametry statistické významnosti jsou zaznamenány v Tab.12 a graficky znázorněny na Obr.15-28. Grafy znázorňují průměrné hodnoty a 95% interval spolehlivosti. Statistický významný rozdíl byl naměřen pouze u DHEAS ( $p=0,021$ ). U ostatních analytů se hodnoty  $p$  pohybovaly nad hladinou významnosti.

*Tab.11 Hladiny stanovovaných analytů v CSF – průměr a 95% intervaly spolehlivosti (nmol/L);*

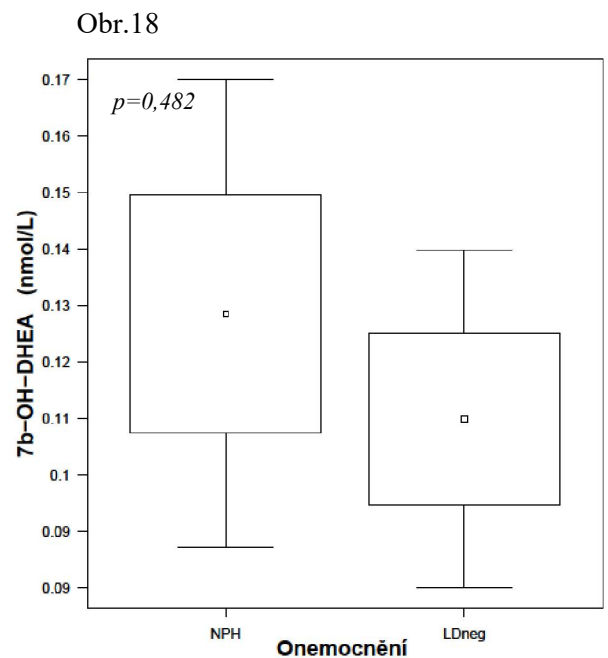
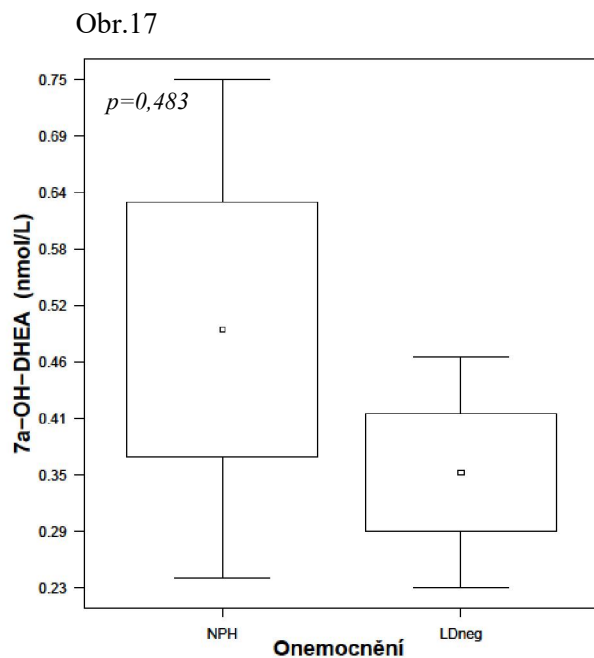
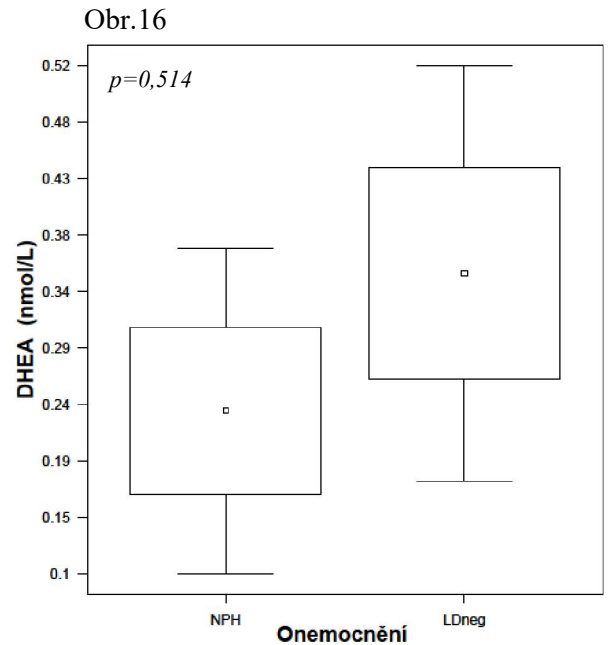
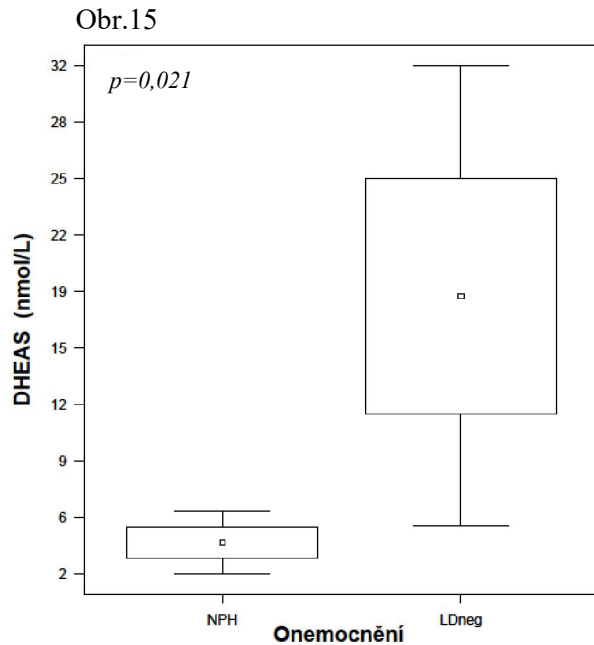
*NPH - pacienti s normotenzním hydrocefalem, LDneg - pacienti s negativním lumbálním drenážním testem*

Analyt (nmol/L)	NPH	LDneg
DHEA	0,235 (0,07;0,137)	0,350 (0,089;0,174)
Kortizol	13,364 (2,13;4,175)	12,001 (1,877;3,679)
Kortizon	12,001 (1,877;3,679)	7,207 (0,985;1,931)
7 $\alpha$ -OH-DHEA	0,498 (0,13;0,254)	0,352 (0,06;0,117)
7 $\beta$ -OH-DHEA	0,132 (0,02;0,04)	0,114 (0,015;0,029)
7-oxo-DHEA	0,036 (0,013;0,025)	0,072 (0,031;0,060)
Aldosteron	0,332 (0,049;0,096)	0,311 (0,042;0,083)
Progesteron	0,003 (0,001;0,001)	0,003 (0,001;0,001)
Pregnenolon	0,028 (0,006;0,011)	0,048 (0,015;0,03)
17-OH-Pregnenolon	0,022 (0,011;0,021)	0,051 (0,025;0,049)
Kortikosteron	0,906 (0,176;0,346)	1,178 (0,283;0,554)
Androstendion	0,342 (0,066;0,130)	0,327 (0,050;0,097)
7 $\beta$ -OH-Epiandrosteron	0,113 (0,024;0,047)	0,104 (0,023;0,045)
DHEAS	4,104 (0,914;1,791)	18,312 (6,767;13,264)

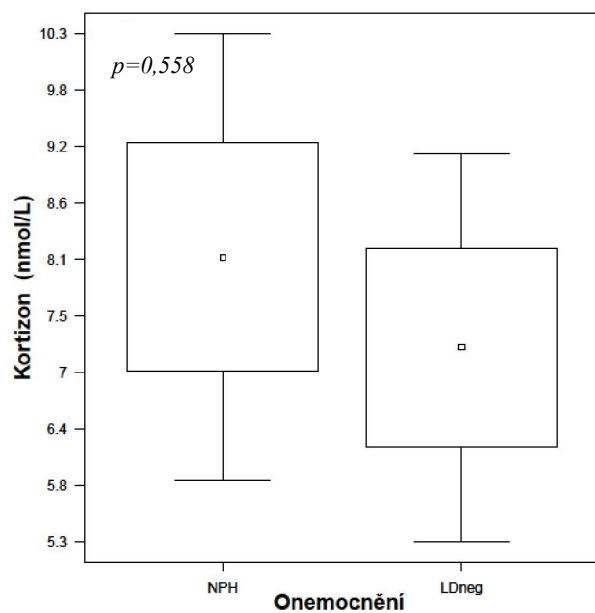
Tab.12 Výsledné hodnoty parametrů statistické významnosti (*p*)

Analyt	<i>p</i>
DHEA	0,514
Kortizol	0,636
Kortizon	0,558
7 $\alpha$ -OH-DHEA	0,483
7 $\beta$ -OH-DHEA	0,482
7-oxo-DHEA	0,925
Aldosteron	0,754
Progesteron	0,974
Pregnenolon	0,780
17-OH-Pregnenolon	0,526
Kortikosteron	0,456
Androstendion	0,862
7 $\beta$ -OH-Epiandrosteron	0,831
DHEAS	0,021

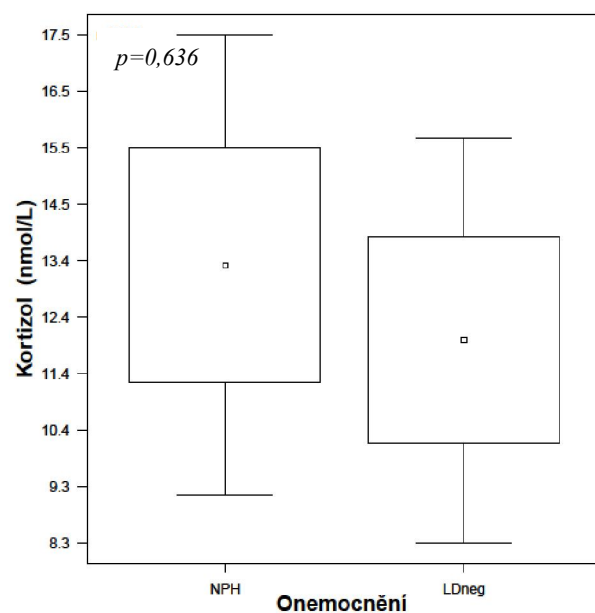
Obr.15-28 Hladiny jednotlivých steroidů v CSF u pacientů s NPH a pacientů s LDneg. Grafy (Box-plot) ukazují průměr a 95% intervaly spolehlivosti. Parametr statistické významnosti ( $p$ ) je zobrazen nad jednotlivými grafy.



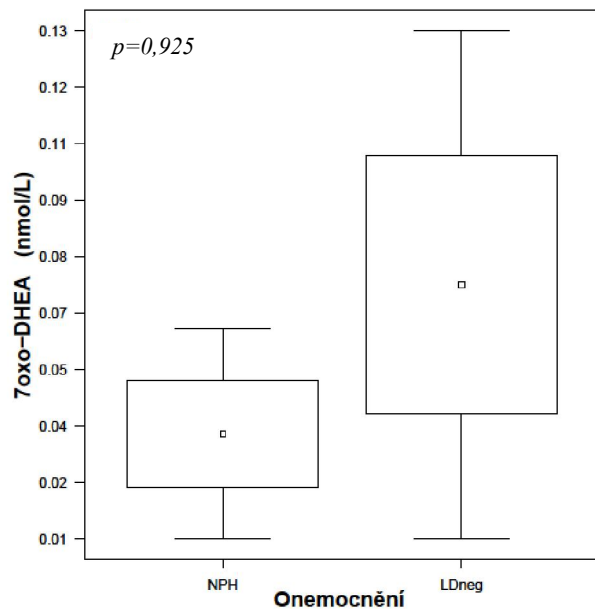
Obr.19



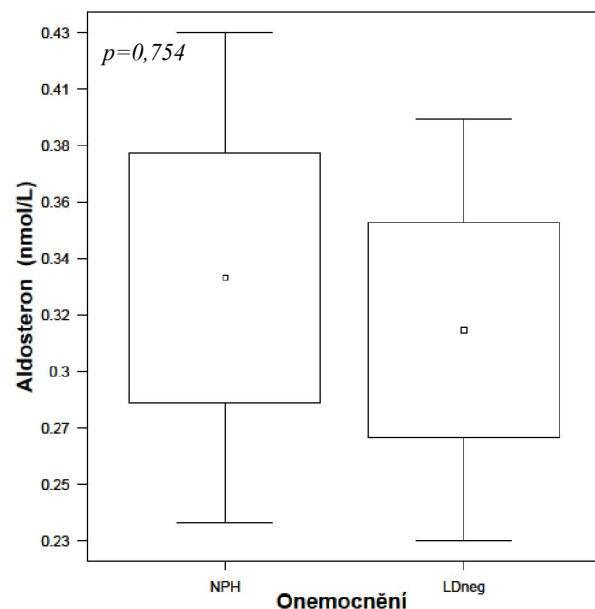
Obr.20



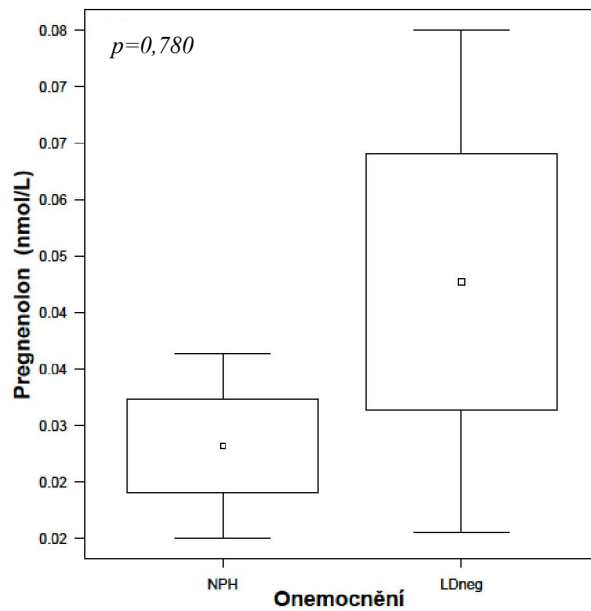
Obr.21



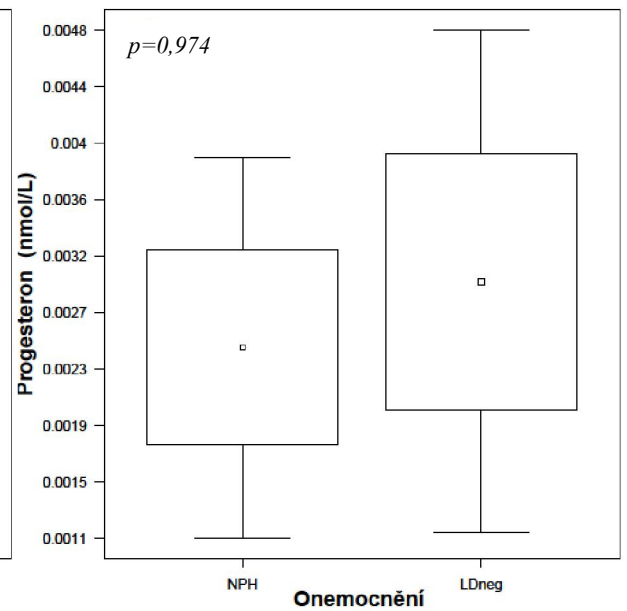
Obr.22



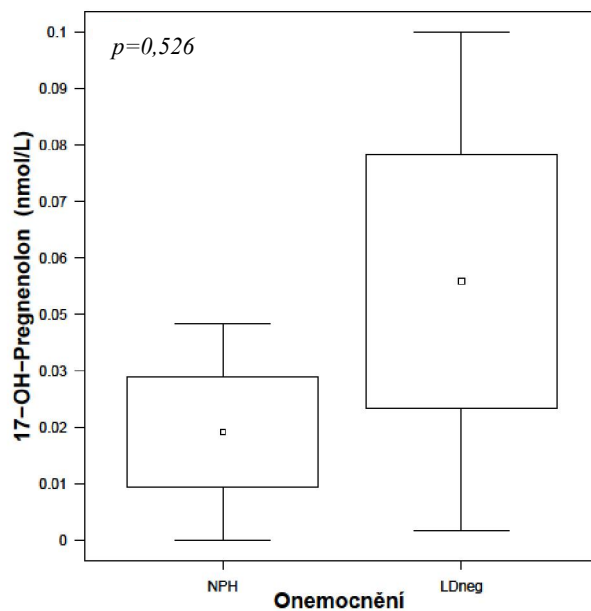
Obr.23



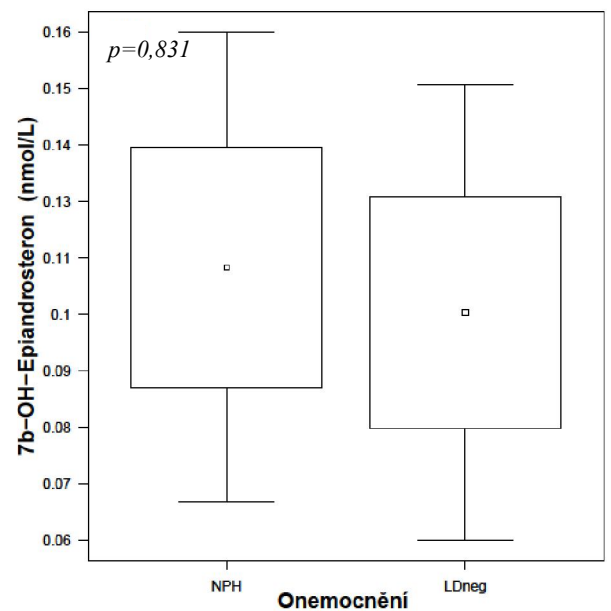
Obr.24



Obr.25

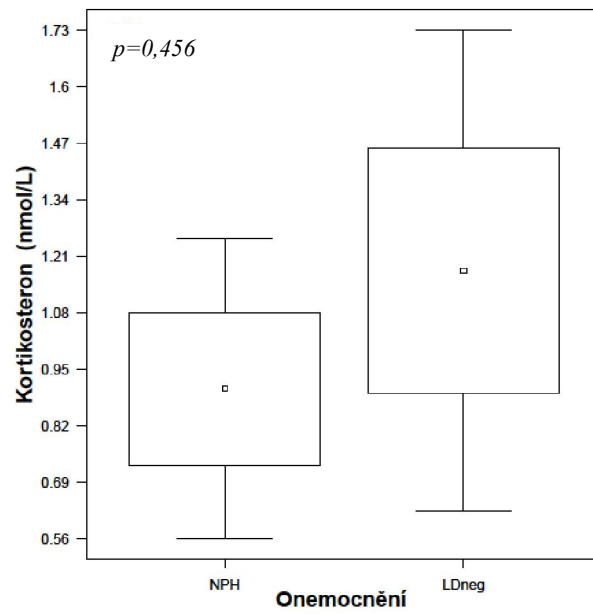


Obr.26

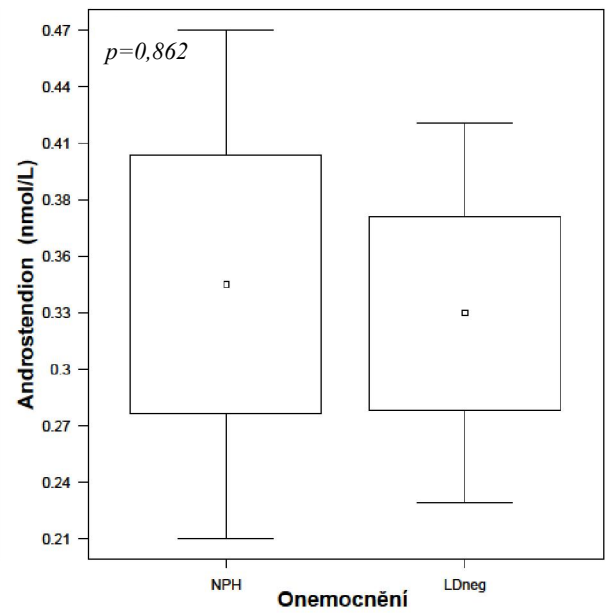




Obr.27



Obr.28



## **6. DISKUZE**

### **6.1 CÍL 1 – VÝVOJ METODIKY PRO STANOVENÍ VYBRANÝCH STEROIDNÍCH HORMONŮ V CSF**

V rámci prvního cíle diplomové práce se autorka podílela na vývoji, optimalizaci a validaci LCMS/MS metody, kterou je možné změřit hladiny základní palety steroidních hormonů v CSF. Námi vyvinutá metoda má oproti klasickým radioimunoanalytickým metodám několik výhod. Patří mezi ně vyšší rychlost, komplexnost, citlivost a preciznost analýzy. Hlavní výhodou metody LCMS/MS je možnost stanovení hladin více analytů najednou, což je nejen časově, ale také finančně výhodnější. Steroidy se v CSF vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (nmol/L-pmol/L) a proto bylo třeba zvýšit intenzitu signálu jednotlivých steroidů na MS. Bylo využito příznivých vlastností derivatizace, při které je na molekulu steroidu navázána další chemická skupina. Výsledkem je zvětšení molekulární hmotnosti analyzované látky, která je tak lépe detekovatelná. Všechny steroidy, které byly vybrány do základní palety, obsahovaly jednu, nebo více keto skupin. Z toho důvodu byl jako derivatizační činidlo vybrán 2-hydrazinopyridin (Higashi et al. 2007).

Naše pracovní skupina opublikovala článek (Sosvorova et al. 2015 a), ve kterém je okomentován postup a výsledky nově vyvinuté metodiky. Vůbec poprvé byl v CSF pomocí instrumentální metody stanoven aldosteron. Článek je součástí přílohy A.

### **6.2 CÍL 2 – POROVNÁNÍ ZÁKLADNÍ PALETY NEUROAKTIVNÍCH A DALŠÍCH STEROIDŮ U PACIENTŮ S NPH A ZDRAVÉHO KONTROLNÍHO SOUBORU**

Na základě získaných informací o dalších neurodegenerativních onemocněních, byla pro analýzu sestavena základní paleta steroidních hormonů a to konkrétně DHEA jeho 7-oxygenované metabolity, kortizol, kortizon a aldosteron. Radioimunoanalyticky byla stanovena hladina DHEAS.

Nově vyvinutou metodou LCMS/MS a radioimunoanalyticky bylo změřeno steroidní spektrum v CSF u pacientů s NPH a kontrolní skupinou (C). Výsledky byly porovnávány se studií doktorky Kolátorové-Sosvorové (Sosvorova et al. 2015 b). S největší statistickou významností se lišily hladiny aldosteronu v CSF, u pacientů s NPH byly jeho hladiny významně vyšší. Aldosteron je hlavní mineralokortikoid, který je zodpovědný za hospodaření

minerálů a vody v těle. Jeho sekrece v CNS je ovlivňována hladinou  $11\beta$ -HSD typu 2, jejíž vysoké koncentrace byly zaznamenány v subkomisurálním orgánu ve třetí mozkové komoře (MacKenzie et al. 2000; Geerling & Loewy 2009). Aldosteron se ukázal jako dobrý ukazatel při zhodnocení celkového stavu pacienta po traumatech či otoku mozku (Tenedieva et al. 1994). Při našem měření byly zjištěny mnohonásobně vyšší hladiny aldosteronu u pacientů s NPH, než u C. Stejný výsledek byl publikován i doktorkou Kolátorovou-Sosvorovou. Aldosteron by se díky svým vlastnostem a účinkům na nervovou tkáň mohl v budoucnu stát zajímavým diagnostickým nástrojem. Další signifikantní rozdíly byly nalezeny u kortizonu. Jak kortizon, tak kortizol nacházející se v CSF jsou periferního původu, procházejí v malých koncentracích skrz BBB. Naměřené vyšší hladiny kortizonu u C než u pacientů s NPH byly pravděpodobně zapříčiněny stresovým faktorem. U probandů ze skupiny C byl CSF odebírán během operace v důsledku prodělaného traumatu. Lze tedy předpokládat, že soubor C byl v mnohem větší psychické i fyzické nepohodě, než pacienti podstupující LDT.

Na základě předchozí studie byly očekávány snížené hladiny DHEA jeho oxygenovaných metabolitů a DHEAS u pacientů s NPH, což se ovšem nepotvrdilo. Tyto analyty mají silné neuroprotektivní a protizánětlivé účinky a jejich snížené hodnoty mimo jiné reflektují neurodegeneraci a zánětlivé procesy v CNS (Kim et al. 2003; Sosvorova et al. 2015 d). Výsledky mohly být ovlivněny nízkým počtem probandů v jednotlivých skupinách a rozdíly tak nemusely být patrné.

Jednoznačné odlišení NPH od C bylo pro výzkum přínosné, nicméně pro diagnostickou praxi již méně použitelné. Při lékařské diagnostice jsou pacienti s podezřením na NPH vyšetřeni pomocí LDT a podle výsledku testu buď indikováni k operativní léčbě, či nikoliv (LDneg). Výsledky LDT nejsou mnohdy zcela jednoznačné a vhodný biologický ukazatel by mohl přispět ke zjednodušení a zpřesnění diagnostiky pacientů s NPH a LDneg.

### **6.3 CÍL 3 – ROZŠÍŘENÍ PALETY STANOVOVANÝCH STEROIDŮ A POROVNÁNÍ JEJICH HLADIN U PACIENTŮ S NPH A PACIENTŮ S LDneg**

#### **S LDneg**

Na základě zajímavých výsledků porovnávání hladin základního steroidního spektra v CSF u pacientů s NPH a C, byl náš výzkum dále zaměřen na složení CSF u pacientů s NPH a LDneg. Tyto dvě skupiny byly již jednou srovnávány, ale pouze z imunologického hlediska. V CSF byly stanovovány hladiny vybraných cytokinů a byly zjištěny vyšší hladiny prozánětlivých interleukinů 1 $\beta$  a 6 a protizánětlivého interleukinu 10 u NPH. Výsledky reflektují jak zánětlivé procesy probíhající v mozku, tak zároveň obrannou reakci těla (Sosvorova et al. 2014; Sosvorova et al. 2015 c). Tato zjištění nás vedla k tomu, aby byla problematika rozlišení těchto dvou skupin prozkoumána i ze steroidního a neurosteroidního hlediska.

Základní spektrum stanovovaných analytů bylo rozšířeno o další steroidy a NS. Aby mohlo dojít k rozšíření stávající metody, kdy se k derivatizaci využívá 2-hydrazinopyridinu, byly zvoleny steroidy, které obsahují keto skupinu. Výběr byl proveden na základě dostupné literatury související s diagnostikou neurodegenerativních onemocnění, synaptickou plasticitou a neuropsychologických chorob a vycházelo se jak ze světové literatury, tak i z prací proběhnuvších na našem pracovišti. Rozšířenou metodou bylo stanoveno 14 analytů a to 8 základních (DHEA a jeho 7-oxygenované metabolity, 16 $\alpha$ -OH-DHEA kortizol, kortizon, aldosteron) a 6 nových (progesteron, pregnenolon, 17-OH-pregnenolon, kortikosteron, androstendion, 7 $\beta$ -OH-epiandrosteron). U obou skupin (NPH a LDneg) byl radioimunoalyticky změřen DHEAS.

Validace rozšířené metody byla provedena pouze dvakrát a to z důvodu nedostatku směsného CSF. V rámci samotného měření byl jako kontrolní vzorek použit stejný směsný CSF jako u validace. Kontroly byly zpracovány ve čtyřplikátu a jejich koncentrace odpovídaly nulovému přídatku validace. Mezi jednotlivými měřeními byly v hodnotách pouze nepatrné odchylky, a proto mohly být výsledky brány za validní.

Jako vhodné nové NS byly vybrány progesteron, pregnenolon a 17-OH-pregnenolon. Pregnenolon je prekurzorem všech steroidů a prostřednictvím vazby na NMDA receptor pozitivně ovlivňuje formování paměti. Nízké koncentrace v cirkulaci limitují syntézu steroidních hormonů jak v CNS tak na periférii. Jedná se o NS s neuroprotektivními a protizánětlivými účinky. Jeho nízké hladiny v krvi byly zaznamenány při výzkumu AD

(Roberts & Fitten 1990) a schizofrenie (Ritsner et al. 2007; Bicikova et al. 2013b). U pacientů s panickou poruchou byly v krvi zjištěny vysoké hladiny pregnenolonu, kdy se tělo snaží působit proti anxiogennímu efektu osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny a snížit citlivost GABA<sub>A</sub> receptoru (Brambilla et al. 2003). U 17-hydroxylovaného derivátu pregnenolonu (17-OH-pregnenolon) byly roku 2004 prokázány vlastnosti NS (Matsunaga et al. 2004). U výzkumu anxiózně-depresivních poruch (Bičíková et al. 2000), epilepsie (Hill et al. 2011) a deprese (Hill et al. 2016b) byly v séru zjištěny vyšší hladiny 17-OH-pregnenolonu než u kontrolního souboru a stejně jako u pregnenolonu to může být zapříčiněno odpovědí organismu na vysokou stimulaci GABA<sub>A</sub> receptoru.

Další ze zásadních NS je progesteron. Zajišťuje protekci před poškozením buňky, umí potenciovat myelinizaci a podílí se na proliferaci prekursorů oligodendrocytů (Ghoumari et al. 2005). Působí jako pozitivní modulátor GABA<sub>A</sub> receptoru a vyznačuje se anxiolytickými účinky. Bylo několikrát potvrzeno, že hladiny progesteronu v CSF reflektují hladiny v krvi (Bakstrom et al. 1976; Schwarz & Pohl 1992; Wang et al. 1997; Kancheva et al. 2010). Jeho zvýšené hladiny byly pozorovány u neuropsychických poruch jako jsou epilepsie, panická porucha, schizofrenie a další (Brambilla et al. 2003; Hill, Vrbíková, et al. 2011; Bicikova et al. 2013).

Již několik let jsou v CSF laboratorních potkanů měřeny hladiny stresového hormonu kortikosteronu (Pollard et al. 1979; Kamilaris et al. 1991; Martinho et al. 2012). Tento glukokortikoid je u lidí spojován převážně s metabolismem minerálních látek a prezentován jako prekursor aldosteronu. Ve studii z roku 2010 byly jeho hladiny měřeny pomocí RIA a to u pacientů výlučně s Parkinsonem, Parkinsonem a depresí a pouze s depresí. Pacienti s Parkinsonem a depresí měli mnohem nižší hladiny kortikosteronu než probandi dalších dvou skupin, čímž bylo potvrzeno jeho protizánětlivé a imunomodulační působení na organismus (Pálhagen et al. 2010).

Pro svou vhodnou chemickou strukturu (alespoň jedna keto skupina) byly do spektra doplněny androstendion a 7β-OH-epiandrosteron. Androstendion je pohlavní hormon, který je prekurzorem testosteronu a estronu. Kromě svých androgenních vlastností má pozitivní účinek na vytváření paměťové stopy (Schwartz et al. 2002). Jeho hladiny byly v CSF v minulosti již detekovány, mimo jiné byla zjištěna pozitivní korelace mezi koncentrací androstendionu v séru a v CSF (Toscano et al. 1991; Schwarz & Pohl 1992; Kancheva et al. 2010). 7β-OH-epiandrosteron je endogenní steroid, který vzniká jako derivát DHEA. Na

animálních modelech byly prokázány jeho neuroprotektivní a protizánětlivé účinky (Pringle et al. 2003; Dudas et al. 2004; Hennebert et al. 2008). Jeho účinky u lidí nebyly zatím více prozkoumány.

Mezi hladinami všech analytů, kromě DHEAS, nebyly u skupin NPH a LDneg bohužel nalezeny žádné statisticky významné rozdíly. Koncentrace DHEAS byly u pacientů s NPH nižší než u LDneg. Hladina by mohla být ovlivněna protektivními vlastnostmi DHEAS v těle, kdy pacienti s NPH mají značně porušenou mozkovou část a lze tedy předpokládat nižší hladiny protizánětlivých a neuroprotektivních NS. DHEAS se podílí také na redukci neurodegenerativních změn spojených se stárnutím, což by vysvětlovalo zvýšenou hladinu u skupiny LDneg. Jedná se pouze o předběžnou prvotní studii, výstupy práce mohly být ovlivněny malým souborem, se kterým jsme pracovali a do budoucna bychom chtěli výsledky ověřit na větší skupině probandů. Dále bychom chtěli rozšířit stanovené spektrum o další NS a steroidy obsahující keto skupinu, jako jsou např. allopregnanolon, 17-OH-progesteron a testosteron. Hladiny těchto steroidů byly již zkoumány v souvislosti s jejich účinky na nervovou tkáň (Bicikova et al. 1998; Rasmusson et al. 2006; Kancheva et al. 2010; Hill et al. 2011; Schule et al. 2014; Hill et al. 2016) a mohly by být dalšími zajímavými předměty výzkumu v oblasti neurodegenerativních onemocnění.

## 7. ZÁVĚR

- V rámci diplomové práce byla vyvinuta LCMS/MS metoda, která slouží ke stanovení základní palety steroidů a NS v CSF. Metodika byla optimalizována a validována. Měřeny byly DHEA, 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA, 16 $\alpha$ -OH-DHEA, kortizol, kortizon a aldosteron. Aldosteron byl v CSF pomocí instrumentální metody změřen vůbec poprvé. Výstupem práce je vydaná publikace v renomovaném zahraničním časopise (příloha A).
- Námi vyvinutou metodou byly změřeny hladiny DHEA, 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA, 16 $\alpha$ -OH-DHEA, kortizolu, kortizonu a aldosteronu v CSF u pacientů s NPH a u kontrolního souboru. Radioimunoanalyticky byly změřeny hladiny DHEAS. Významně vyšší hladiny u NPH byly zaznamenány u aldosteronu, což je steroid se silnými mineralokortikoidními účinky. Jeho hladina je ovlivňována aktivitou enzymu 11 $\beta$ -HSD typu 2, jež brání navázání kortizolu na mineralokortikoidní receptor, který tak zůstává volný pro aldosteron. Statisticky významný rozdíl byl naměřen také u kortizonu. Jeho vysoké hladiny u kontrolní skupiny byly patrně způsobeny stresovým faktorem, který odběru předcházela. Další signifikantní rozdíly mezi skupinami nalezeny nebyly.
- Pro lékařskou praxi by bylo vhodné najít laboratorní marker umožňující rozlišení pacientů s NPH a pacientů s podobnými klinickými příznaky (LDneg). Základní spektrum steroidů bylo rozšířeno o progesteron, pregnenolon, 17-OH-pregnenolon, kortikosteron, androstendion a 7 $\beta$ -OH-epiandrosteron, jejichž hladiny v CSF byly stanoveny u pacientů s NPH a pacientů s LDneg. Radioimunoanalyticky byl u těchto skupin stanoven DHEAS, jediný analyt, u kterého byly naměřeny rozdílné koncentrace mezi skupinami. Nižší hladiny DHEAS u NPH mohou poukazovat na větší míru neurodegenerace u této skupiny probandů a reflektovat tak jeho neuroprotektivní a protizánětlivé vlastnosti.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abbott, N.J. et al., 2010. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), pp.13–25
- Adeloye, A., 1977. The aqueduct of Sylvius. *Surgical neurology*, 8(6), pp.458–60
- Akwa, Y. et al., 1993. Astrocytes and neurosteroids: metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density. *The Journal of Cell Biology*, 121(1), pp.135–143
- Alp, M.S., 1995. What is a Torkildsen shunt? *Surgical Neurology*, 43(4), pp.405–406
- Angelopoulos, M., Gupta, S.R. & Azat Kia, B., 1995. Primary intraventricular hemorrhage in adults: clinical features, risk factors, and outcome. *Surgical neurology*, 44(5), pp.433–6
- Arundine, M. & Tymianski, M., 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34(4-5), pp.325–337
- Aschoff, A. et al., 1999. The scientific history of hydrocephalus and its treatment. *Neurosurgical Review*, 22(2-3), pp.67–93
- Bakstrom, T., Carstensen, H. & Sodergard, R., 1976. Concentration of estradiol, testosterone and progesterone in cerebrospinal fluid compared to plasma unbound and total concentrations. *Journal of Steroid Biochemistry*, 7(6-7), pp.469–472
- Barbaccia, M.L. et al., 1997. The effects of inhibitors of GABAergic transmission and stress on brain and plasma allopregnanolone concentrations. *British journal of pharmacology*, 120(8), pp.1582–1588
- Barnard, G. & Kohen, F., 1990. Idiometric assay: Noncompetitive immunoassay for small molecules typified by the measurement of estradiol in serum. *Clinical Chemistry*, 36(11), pp.1945–1950
- Baulieu, E.E. et al., 2000. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), pp.4279–4284
- Baulieu, E.E., 1988. Molecular mechanism of antisteroid hormones at the receptor level. *Kidney international. Supplement*, 26, pp.S2–7
- Baulieu, E.E., 1998. Neurosteroid : A novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*, 23(8), pp.963–87
- Baulieu, E.E. & Schumacher, M., 2000. Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. In *Steroids*. pp. 605–612
- Beekman, M. et al., 1998. Reversal of behavioral effects of pentylenetetrazol by the neuroactive steroid ganaxolone. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 284(3), pp.868–77
- Begley, D. & Brightman, M., 2003. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Progress in drug research*, 61, pp.39–78
- Bech, R.A. et al., 1997. Frontal brain and leptomeningeal biopsy specimens correlated with cerebrospinal fluid outflow resistance and B-wave activity in patients suspected of normal-pressure hydrocephalus. *Neurosurgery*, 40(3), pp.497–502
- Belelli, D. et al., 1996. Modulation of human recombinant GABA(A) receptors by pregnanediols. *Neuropharmacology*, 35(9-10), pp.1223–1231
- Berson, S.A. & Yalow, R.S., 1959. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *The Journal of clinical investigation*, 38, pp.1996–2016



- Bicikova, M. et al., 2013a. Determination of steroid metabolome as a possible tool for laboratory diagnosis of schizophrenia. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 133, pp.77–83
- Bicikova, M. et al., 2004. Plasma levels of 7-hydroxylated dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolites and selected amino-thiols as discriminatory tools of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42(5), pp.518–524
- Bicikova, M. et al., 1998. Serum Levels of Neurosteroid Allopregnanolone in Patients with Premenstrual Syndrome and Patients after Thyroidectomy. *Endocr Regul*, 32(2), pp.87–92
- Bičíková, M. et al., 2000. Serum concentrations of some neuroactive steroids in women suffering from mixed anxiety-depressive disorder. *Neurochemical Research*, 25(12), pp.1623–1627.
- Bloomfield, I.G., Johnston, I.H. & Bilston, L.E., 1998. Effects of proteins, blood cells and glucose on the viscosity of cerebrospinal fluid. *Pediatric Neurosurgery*, 28(5), pp.246–251
- Blum, A. & Maser, E., 2003. Enzymology and Molecular Biology of Glucocorticoid Metabolism in Humans. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 75, pp.173–216
- Bondurant, C.P. & Jimenez, D.F., 1995. Epidemiology of Cerebrospinal Fluid Shunting. *Pediatric Neurosurgery*, 23(5), pp.254–259
- Brambilla, F. et al., 2003. Neurosteroid secretion in panic disorder. *Psychiatry research*, 118(2), pp.107–16
- Brean, A. et al., 2009. Five-year incidence of surgery for idiopathic normal pressure hydrocephalus in Norway. *Acta Neurologica Scandinavica*, 120(5), pp.314–316
- Bullock, A.E. et al., 1997. Neurosteroids modulate nicotinic receptor function in mouse striatal and thalamic synaptosomes. *Journal of neurochemistry*, 68(6), pp.2412–23
- Burt, M.G. et al., 2013. Free and total plasma cortisol measured by immunoassay and mass spectrometry following ACTH1-24 stimulation in the assessment of pituitary patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(5), pp.1883–1890
- Canale, D.J. & Longo, L.D., 1990. Harvey Cushing and pediatric neurosurgery. *Neurosurgery*, 27(4), pp.602–611
- Carta, M.G., Bhat, K.M. & Preti, A., 2012. GABAergic neuroactive steroids: a new frontier in bipolar disorders? *Behavioral and Brain Functions*, 8(1), p.61
- Caruso, D. et al., 2014. Neuroactive steroid levels in plasma and cerebrospinal fluid of male multiple sclerosis patients. *Journal of neurochemistry*, 130(4), pp.591–7
- Carver, C. & Reddy, D.S., 2016. Neurosteroid Structure-Activity Relationships for Functional Activation of Extrasynaptic delta-GABA-A Receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 357(1), pp.188–204
- Compagnone, N.A. & Mellon, S.H., 2000. Neurosteroids: Biosynthesis and Function of These Novel Neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21(1), pp.1–56
- Corpéchet, C. et al., 1981. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(8), pp.4704–4707
- Cserr, H.F. & Bundgaard, M., 1984. Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. *The American journal of physiology*, 246(3 Pt 2), pp.R277–88
- Davson, H., Hollingsworth, G. & Segal, M.B., 1970. The mechanism of drainage of the cerebrospinal fluid. *Brain*, 93(4), pp.665–678

- Devito, E.E. et al., 2005. The neuropsychology of normal pressure hydrocephalus (NPH). *British journal of neurosurgery*, 19, pp.217–224
- Doble, A., 1999. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 81(3), pp.163–221
- Domínguez, M.-I. et al., 2006. Neural overexcitation and implication of NMDA and AMPA receptors in a mouse model of temporal lobe epilepsy implying zinc chelation. *Epilepsia*, 47(5), pp.887–99
- Doraiswamy, P.M., 2003. The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in Alzheimer's disease: therapeutic potential. *Current neurology and neuroscience reports*, 3(5), pp.373–8
- Doležalová, V., 1995. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. 4. přeprac. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví
- Draper, N. & Stewart, P.M., 2005. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *Journal of Endocrinology*, 186(2), pp.251–271
- Dudas, B. et al., 2004. Protection against inflammatory neurodegeneration and glial cell death by 7 $\beta$ -hydroxy epiandrosterone, a novel neurosteroid. *Neurobiology of Disease*, 15(2), pp.262–268
- Dunn, W.B. & Ellis, D.I., 2005. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 24(4), pp.285–294
- Dušková, M. et al., 2016. A Comparison of Salivary Steroid Levels during Diagnostic Tests for Adrenal Insufficiency. *Prague Medical Report*, 117(1), pp.18–33
- Dušková, M. et al., 2015. The steroid metabolome in men with mood and anxiety disorders. *Physiological Research*, 64, pp.S275–S282
- Flood, J.F., Morley, J.E. & Roberts, E., 1995. Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: the amygdala is by far the most sensitive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(23), pp.10806–10
- Foltz, E.L. & Ward Jr, A.A., 1956. Communicating hydrocephalus from subarachnoid bleeding. *Journal of Neurosurgery*, 13(6), p.546
- Frank, C. & Sagratella, S., 2000. Neuroprotective effects of allopregnenolone on hippocampal irreversible neurotoxicity in vitro. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 24(7), pp.1117–1126
- Gasior, M., Carter, R.B. & Witkin, J.M., 1999. Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. *Trends in pharmacological sciences*, 20(3), pp.107–112
- Gaskell, S.J., 1997. Electrospray: Principles and practice. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(7), pp.677–688
- Geerling, J.C. & Loewy, A.D., 2009. Aldosterone in the brain. *American journal of physiology. Renal physiology*, 297(3), pp.F559–F576
- Ghoumari, A.M., Baulieu, E.E. & Schumacher, M., 2005. Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. *Neuroscience*, 135(1), pp.47–58
- Gjerris, F., 1996. Hydrocephalus first illustrated. *Neurosurgery*, 39(1), p.210
- Gjerris, F. & Snorrason, E., 1992. The history of hydrocephalus. *Journal of the history of the neurosciences*, 1(4), pp.285–312
- Greitz, D. et al., 1992. Pulsatile brain movement and associated hydrodynamics studied by magnetic resonance phase imaging. The Monro-Kellie doctrine revisited. *Neuroradiology*, 34(5), pp.370–380

- Greitz, D., Franck, A. & Nordell, B., 1993. On the pulsatile nature of intracranial and spinal CSF-circulation demonstrated by MR imaging. *Acta radiologica*, 34(4), pp.321–8
- Griebel, R.W. et al., 1989. The importance of “accessory” outflow pathways in hydrocephalus after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 24(2), pp.187–192
- Guenoun, R. et al., 1995. A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/5-4-isomerase (3 $\beta$ -HSD), is expressed in rat brain. *Molecular Brain Research*, 30(2), pp.287–300
- Hägström, M., 2014. Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *Wikiversity Journal of Medicine*, 1(1), pp.1–7
- Hähnel, E., Wilkinson, S.P. & Hähnel, R., 1985. Urinary steroid profiles in pregnancy by capillary column gas chromatography. *Clinica Chimica Acta*, 151(3), pp.259–271
- Hakim, S. & Adams, R.D., 1965. The special clinical problem of symptomatic hydrocephalus with normal cerebrospinal fluid pressure. Observations on cerebrospinal fluid hydrodynamics. *Journal of the neurological sciences*, 2(4), pp.307–327
- Haml, Morfin & Starka, 1997. Minireview 7-hydroxylated derivatives of dehydroepiandrosterone: What are they good for? *Endocrine regulations*, 31(4), pp.211–218
- Haml, R. et al., 2003. Relationship of dehydroepiandrosterone and its 7-hydroxylated metabolites to thyroid parameters and sex hormone-binding globulin (SHBG) in healthy subjects. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 41(8), pp.1081–6
- Haring, R. et al., 2013. Testosterone and cardiometabolic risk in the general population - the impact of measurement method on risk associations: A comparative study between immunoassay and mass spectrometry. *European Journal of Endocrinology*, 169(4), pp.463–470
- Harris, P., 1962. Chronic progressive communicating hydrocephalus due to protein transudates from brain and spinal tumours. *Developmental medicine and child neurology*, 4, pp.270–8
- Harrison, N. & Simmonds, M., 1984. Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anesthetic. *Brain research*, 323, pp.287–292
- Hebb, A.O. et al., 2001. Idiopathic normal pressure hydrocephalus: a systematic review of diagnosis and outcome. *Neurosurgery*, 49(5), pp.1166–84; discussion 1184–6
- Helcl, F., 1998. Historie chirurgické léčby hydrocefalu. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 61/94(5), pp.239–244
- Hennebert, O. et al., 2007. 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol and 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol as substrates for the human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Steroids*, 72(13), pp.855–864
- Hennebert, O. et al., 2008. Anti-inflammatory effects and changes in prostaglandin patterns induced by 7 $\beta$ -hydroxyepiandrosterone in rats with colitis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 110(3-5), pp.255–262
- Heydari, B. & Le Mellédo, J.-M., 2002. Low pregnenolone sulphate plasma concentrations in patients with generalized social phobia. *Psychological medicine*, 32(5), pp.929–33
- Higashi, T. et al., 2007. Alternative procedure for charged derivatization to enhance detection responses of steroids in electrospray ionization-MS. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 55(4), pp.662–665
- Hill, M. et al., 1999. Age Relationships and Sex Differences in Serum Levels of Pregnenolone and 17-Hydroxypregnenolone in Normal Subjects. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 37(4), pp.439–447
- Hill, M. et al., 2016b. Circulating C19 steroids and progesterone metabolites in women with acute depression and anxiety disorders. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 26(3), pp.153–64
- Hill, M., Vrbíková, J., et al., 2011. The steroid metabolome in lamotrigine-treated women with epilepsy. *Steroids*, 76(12), pp.1351–1357

- Hillen, T. et al., 2000. DHEA-S plasma levels and incidence of Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*, 47(2), pp.161–163
- Chen, I.H. et al., 1994. Effectiveness of shunting in patients with normal pressure hydrocephalus predicted by temporary, controlled-resistance, continuous lumbar drainage: a pilot study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 57(11), pp.1430–1432
- Irwin, R.W., Solinsky, C.M. & Brinton, R.D., 2014. Frontiers in therapeutic development of allopregnanolone for Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8(July), p.203
- Jaraj, D. et al., 2014. Prevalence of idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *Neurology*, 82(16), pp.1449–1454
- Jönsson, B. a. G.G. et al., 2003. Determination of cortisol in human saliva using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 784(1), pp.63–68
- Kahlon, B., Sundbärg, G. & Rehnörona, S., 2005. Lumbar infusion test in normal pressure hydrocephalus. *Acta Neurologica Scandinavica*, 111(6), pp.379–384
- Kalimi, M. et al., 1994. Anti-glucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Molecular and cellular biology*, 131(2), pp.99–104
- Kamilaris, T.C. et al., 1991. Effects of short and long duration hypothyroidism and hyperthyroidism on the plasma adrenocorticotropin and corticosterone responses to ovine corticotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology*, 128(5), pp.2567–2576
- Kancheva, R., Hill, M., et al., 2011. Neuroactive steroids in periphery and cerebrospinal fluid. *Neuroscience*, 191, pp.22–27
- Kancheva, R. et al., 2010. Peripheral neuroactive steroids may be as good as the steroids in the cerebrospinal fluid for the diagnostics of CNS disturbances. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 119(1-2), pp.35–44
- Katzman, R. & Hussey, F., 1970. A simple constant-infusion manometric test for measurement of CSF absorption. I. Rationale and method. *Neurology*, 20(6), pp.534–544
- Kazihnitkova, H. et al., 2004. Simultaneous determination of dehydroepiandrosterone, its 7-hydroxylated metabolites, and their sulfates in rat brain tissues. *Steroids*, 69(10), pp.667–674
- Kihel, L. El, 2012. Oxidative metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) and biologically active oxygenated metabolites of DHEA and epiandrosterone (EpiA) - Recent reports. *Steroids*, 77(1-2), pp.10–26
- Kim, S.-B. et al., 2003. Neurosteroids: Cerebrospinal fluid levels for Alzheimer's disease and vascular dementia diagnostics. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88(11), pp.5199–206
- Krauss, J. et al., 2001. Evaluation of Gait in Normal Pressure Hydrocephalus Before and After Shunting. In *Gait Disorders. Advances in Neurology*. pp. 301–310
- Kuba, H. et al., 2002. Gait disturbance in patients with low pressure hydrocephalus. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 9(1), pp.33–6
- Kubo, S., Nakata, H. & Yoshimine, T., 2001. Peritoneal shunt tube placement performed using an endoscopic threaded imaging port. *Journal of neurosurgery*, 94(4), pp.677–9
- Kurita, H. et al., 2013. Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (S) levels in medicated patients with major depressive disorder compared with controls. *Journal of Affective Disorders*, 146(2), pp.205–212
- Kushnir, M.M. et al., 2003. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urinary free cortisol. *Clinical Chemistry*, 49(6), pp.965–967
- L'Hermite, M. & Midgley, A.J., 1971. Radioimmunoassay of human follicle-stimulating hormone with antisera to the ovine hormone. *The Journal of clinical Endocrinology and metabolism*, 33(1), pp.68–76
- Lambert, J.J. et al., 1995. Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16(9), pp.295–303

- Lambert, N. & Grover, L., 1995. The mechanism of biphasic GABA responses. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5226), pp.928–929
- Lancel, M. et al., 1996. Progesterone induces changes in sleep comparable to those of agonistic GABAA receptor modulators. *The American journal of physiology*, 271(4 Pt 1), pp.E763–72
- Lanzino, G., Dipierro, C.G. & Laws, E.R., 1997. One century after the description of the “sign”: Joseph babinski and his contribution to neurosurgery. *Neurosurgery*, 40(4), pp.822–828
- Lapcik, O. et al., 1999. Radioimmunoassay of Phytoestrogens of Isoflavone Series. *Journal of Medicinal Food*, 2(3–4), pp.207–208
- Lavaque, E. et al., 2006. Steroidogenic acute regulatory protein in the brain. *Neuroscience*, 138(3), pp.741–747
- Leblhuber, F. et al., 1990. Dehydroepiandrosterone sulphate in Alzheimer’s disease. *The Lancet*, 336(8712), pp.449–450
- Longone, P. et al., 2011. Neurosteroids as neuromodulators in the treatment of anxiety disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 2(OCT), pp.1–9
- Lykkesfeldt, J., Loft, S. & Poulsen, H.E., 1994. Simultaneous determination of urinary free cortisol and 6a-hydroxycortisol by high-performance liquid chromatography to measure human CYP3A activity. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 660(1), pp.23–29
- Lynch, M.A., 2004. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews*, 84(1), pp.87–136
- Lyons, A.E., 1995. Hydrocephalus first illustrated. *Neurosurgery*, 37(3), pp.511–3
- Lyons, M.K. & Meyer, F.B., 1990. Cerebrospinal fluid physiology and the management of increased intracranial pressure. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, 65(5), pp.684–707
- MacKenzie, S.M. et al., 2000. Expression of 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase genes in the rat brain. *Journal of molecular endocrinology*, 24(3), pp.321–328
- Majewska, M.D., 1992. Neurosteroids: Endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor mechanism of action and physiological significance. *Progress in Neurobiology*, 38(4), pp.379–394
- Majewska, M.D. et al., 1986. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 232(4753), pp.1004–1007
- Maninger, N., Wolkowitz, O.M., et al., 2009. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(1), pp.65–91
- March, R.E., Hughes, R. & Todd, J., 1989. *Quadrupole storage mass spectrometry* first. John Wiley and Sons, Hoboken.
- Marmarou, A. et al., 2005. Guidelines for management of idiopathic normal pressure hydrocephalus: progress to date. *Acta neurochirurgica. Supplement*, 95, pp.237–240
- Martinho, A. et al., 2012. Stress and glucocorticoids increase transthyretin expression in rat choroid plexus via mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Journal of Molecular Neuroscience*, 48(1), pp.1–13
- Matsunaga, M. et al., 2004. 7alpha-Hydroxypregnenolone acts as a neuronal activator to stimulate locomotor activity of breeding newts by means of the dopaminergic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), pp.17282–7
- Meier, U., 2003. Shunt-Operation versus endoskopische Ventrikulostomie beim Normaldruckhydrozephalus : Diagnostik und Outcome. *Zentralblatt für Neurochirurgie*, 64(1), pp.19–23
- Milhorat, T.H., 1974. Failure of choroid plexectomy as treatment for hydrocephalus. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 139(4), pp.505–508

- Miyagami, M., Nakamura, S. & Moriyasu, N., 1975. [Hydrodynamic of the C.S.E. under experimental occlusion of superior sagittal sinus (author's transl)]. *No Shinkei Geka*, 3(9), pp.739–745
- Mizee, M.R. et al., 2014. Astrocyte-derived retinoic acid: a novel regulator of blood-brain barrier function in multiple sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 128(5), pp.691–703
- Moffat, S.D. et al., 2000. The relationship between longitudinal declines in dehydroepiandrosterone sulfate concentrations and cognitive performance in older men. *Archives of internal medicine*, 160(14), pp.2193–8
- Morfin, R. & Stárka, L., 2001. Neurosteroid 7-hydroxylation products in the brain. *International review of neurobiology*, 46, pp.79–95
- Moss, S.J. & Smart, T.G., 2001. Constructing inhibitory synapses. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(4), pp.240–250
- Nahar, L., Sarker, S. & Turner, A., 2007. A Review on Synthetic and Natural Steroid Dimers: 1997-2006. *Current Medicinal Chemistry*, 14(12), pp.1349–1370
- Nakaguchi, H. & Miyamoto, M., 2001. Obstructive hydrocephalus caused by intraventricular collapse of malacotic brain. Case report. *Journal of neurosurgery*, 95(1), pp.119–21
- Ng, S.E.S. et al., 2009. Value of quantitative MRI biomarkers (Evans' index, aqueductal flow rate, and apparent diffusion coefficient) in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 30(4), pp.708–715
- Niro, S. et al., 2012. The DHEA metabolite 7 $\beta$ -hydroxy-epiandrosterone exerts anti-estrogenic effects on breast cancer cell lines. *Steroids*, 77(5), pp.542–551
- Nováková, L. & Douša, M., 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I a II*, Praha 5.
- Nulsen, F.E. & Spitz, E.B., 1951. Treatment of hydrocephalus by direct shunt from ventricle to jugular vein. *Surgical Forum*, pp.399–403
- Pálhagen, S. et al., 2010. Monoamines, BDNF, IL-6 and corticosterone in CSF in patients with Parkinson's disease and major depression. *Journal of Neurology*, 257(4), pp.524–532
- Papadopoulos, V. et al., 2006. Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(8), pp.402–409
- Park-Chung, M., Wu, F.S. & Farb, D.H., 1994. 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Molecular Pharmacology*, 46(1), pp.146–150
- Petrovic, M. et al., 2005. 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(37), pp.8439–50
- Picascia, M. et al., 2015. A review of cognitive impairment and differential diagnosis in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Functional Neurology*, 30(4), pp.217–228
- Plassart-schiess, E. & Baulieu, E., 2001. Neurosteroids : recent findings. *Brain Res Brain Res Rev.*, 37(1-3), pp.133–140
- Pollard, I., Bassett, J.R. & Cairncross, K.D., 1979. Plasma thyroid hormone and glucocorticosteroid concentrations in the male rat following prolonged exposure to stress. *Australian journal of biological sciences*, 32(2), pp.237–42
- Popp, J. et al., 2009. CSF cortisol in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 30(3), pp.498–500
- Pringle, A.K. et al., 2003. 7-Hydroxylated epiandrosterone (7-OH-EPIA) reduces ischaemia-induced neuronal damage both in vivo and in vitro. *European Journal of Neuroscience*, 18(1), pp.117–124
- Rasmusson, A.M. et al., 2006. Decreased Cerebrospinal Fluid Allopregnanolone Levels in Women with Posttraumatic Stress Disorder. *Biological Psychiatry*, 60(7), pp.704–713

- Reddy, D., 2010. Neurosteroids: Endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog Brain Res*, 186, pp.113–137
- Reddy, D.S., 2006. Physiological role of adrenal deoxycorticosterone-derived neuroactive steroids in stress-sensitive conditions. *Neuroscience*, 138(3), pp.911–920
- Relkin, N. et al., 2005. INPH guidelines, part II: Diagnosing idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *Neurosurgery*, 57(3 SUPPL.), pp.S4–16
- Rick, C.E. et al., 1998. Neurosteroids act on the GABA(A) receptor at sites on the N-terminal side of the middle of TM2. *Neuroreport*, 9(3), pp.379–83
- Ritsner, M. et al., 2007. Differences in blood pregnenolone and dehydroepiandrosterone levels between schizophrenia patients and healthy subjects. *European Neuropsychopharmacology*, 17(5), pp.358–365
- Roberts, E. & Fitten, L., 1990. Serum steroid levels in two old men with Alzheimer's disease (AD) before and after oral administration of dehydroepiandrosterone (DHEA). Pregnenolone synthesis may be rate-limiting in aging. In M.Kalimi & W. Regelson, eds. *The biological role of Dehydroepiandrosterone (DHEA)*. Berlin: de Gruyter, pp. 43–63.
- Rogawski, M.A. & Porter, R.J., 1990. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacological reviews*, 42(3), pp.223–86
- Rotaru, D.C. et al., 2011. Glutamate receptor subtypes mediating synaptic activation of prefrontal cortex neurons: relevance for schizophrenia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(1), pp.142–56
- Rothstein, J., 1995. Excitotoxicity and neurodegeneration in lateral sclerosis. *Clinical neuroscience*, 10, pp.348–359
- Rousseau, G.G., 2013. Fifty years ago: The quest for steroid hormone receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 375(1-2), pp.10–13
- Sabeti, J. et al., 2007. Steroid pregnenolone sulfate enhances NMDA-receptor-independent long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses: Role for L-type calcium channels and sigma-receptors. *Hippocampus*, 17(5), pp.349–369
- Sakakibara, R. et al., 2008. Mechanism of bladder dysfunction in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Neurology and Urodynamics*, 27(6), pp.507–510
- Sherwin, B.B., 2003. Steroid hormones and cognitive functioning in aging men: a mini-review. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 20(3), pp.385–93
- Schule, C., Nothdurfter, C. & Rupprecht, R., 2014. The role of allopregnanolone in depression and anxiety. *Progress in Neurobiology*, 113, pp.79–87
- Schumacher, M. et al., 1993. The oxytocin receptor: a target for steroid hormones. *Regulatory peptides*, 45(1-2), pp.115–9
- Schutz, H. et al., 1983. Determination of CSF shunt patency with a lumbar infusion test. *J Neurosurg*, 58(4), pp.553–556
- Schwartz, M. et al., 2002. Effects of androstenedione on long term potentiation in the rat dentate gyrus: Relevance for affective and degenerative diseases. *Brain Research Bulletin*, 58(2), pp.207–211
- Schwarz, S. & Pohl, P., 1992. Steroid hormones and steroid hormone binding globulins in cerebrospinal fluid studied in individuals with intact and with disturbed blood-cerebrospinal fluid barrier. *Neuroendocrinology*, 55(2), pp.174–182
- Silberzahn, P. et al., 1985. Gas chromatography-mass spectrometry of androgens in equine ovarian follicles at ultrastructurally defined stages of development. Identification of 19-nortestosterone in follicular fluid. *Endocrinology*, 117(5), pp.2176–2181

- Sokić, D. V et al., 1992. The intrathecal manometric lumbar infusion test (Katzman Test) in the diagnosis of normotensive hydrocephalus. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*, 120(1-2), pp.39–47
- Sosvorova, L. et al., 2014. Selected pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebrospinal fluid in normal pressure hydrocephalus. *Neuro Endocrinol Lett*, 35(7), pp.586–593
- Sosvorova, L., Vitku, J., et al., 2015a. Determination of seven selected neuro- and immunomodulatory steroids in human cerebrospinal fluid and plasma using LC-MS/MS. *Steroids*, 98, pp.1–8
- Sosvorova, L., Hill, M., Mohapl, M., et al., 2015b. Steroid hormones in prediction of normal pressure hydrocephalus. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 152, pp.124–132
- Sosvorova, L., Mohapl, M., et al., 2015c. The Impact of selected cytokines in the follow-up of normal pressure hydrocephalus. *Physiological Research*, 64, pp.S283–S290
- Sosvorova, L., Mohapl, M., Hill, M., et al., 2015d. Steroid hormones and homocysteine in the outcome of patients with normal pressure hydrocephalus. *Physiological Research*, 64, pp.S227–S236
- Speake, T. et al., 2001. Mechanisms of CSF secretion by the choroid plexus. *Microscopy Research and Technique*, 52(1), pp.49–59
- Steriade, M., 2001. Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *Journal of neurophysiology*, 86(1), pp.1–39
- Standring, S., 2005. *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*. 39th ed. / . New York: Elsevier Churchill Livingstone
- .Sulla, I., Fagul'a, J. & Santa, M., 1989. Brain abscess as a cause of infant hydrocephalus. Case report. *Zentralblatt für Neurochirurgie*, 50(3-4), pp.199–200
- Tajes, M. et al., 2014. The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Molecular membrane biology*, 31(5), pp.152–67
- Tarnaris, A., Watkins, L.D. & Kitchen, N.D., 2006. Biomarkers in chronic adult hydrocephalus. *Cerebrospinal fluid research*, 3, p.11
- Taverniers, I., De Loose, M. & Van Bockstaele, E., 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), pp.535–552
- Tenedieva, V.D. et al., 1994. The CSF aldosterone in brain tumors with brain edema. *Acta neurochirurgica. Supplementum*, 60, pp.390–394
- Toscano, V. et al., 1991. Cerebrospinal fluid estrone in pseudotumor cerebri: A change in cerebral steroid hormone metabolism? *Journal of Endocrinological Investigation*, 14(2), pp.81–86
- Trojan, S., (2003). *Lékařská fyziologie*. Grada, Praha
- Ueno, M. et al., 2015. Blood-brain barrier damage in vascular dementia. *Neuropathology*, 26(2), pp.115-24
- Vallée, M. et al., 1997. Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), pp.14865–14870.
- Vanek, P. & Sames, M., 2003. The lumbar infusion test and transcranial Doppler ultrasonography in the diagnosis and treatment of normotensive hydrocephalus. Prospective evaluation of a group of patients from 2000 to 2002. *Casopis lekaru ceskych*, 142(9), pp.545–550



- Vitkin, E. et al., 2014. Peer group normalization and urine to blood context in steroid metabolomics: The case of CAH and obesity. *Steroids*, 88, pp.83–89
- Wang, M. De, Wahlström, G. & Bäckström, T., 1997. The regional brain distribution of the neurosteroids pregnenolone and pregnenolone sulfate following intravenous infusion. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 62(4), pp.299–306
- Wanifuchi, H., Shimizu, T. & Maruyama, T., 2002. Age-related changes in the proportion of intracranial cerebrospinal fluid space measured using volumetric computerized tomography scanning. *Journal of neurosurgery*, 97(3), pp.607–10
- Wolkowitz, O.M. & Reus, V.I., 2003. Neurotransmitters, neurosteroids and neurotrophins: new models of the pathophysiology and treatment of depression. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, 4(3), pp.98–102
- Wood, J.H. et al., 1974. Normal pressure hydrocephalus: diagnosis and patient selection for shunt surgery. *Neurology*, 24(6), pp.517–526
- Wu, F.S., Gibbs, T.T. & Farb, D.H., 1990. Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Molecular pharmacology*, 37(5), pp.597–602
- Wu, F.S., Gibbs, T.T. & Farb, D.H., 1991. Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Molecular Pharmacology*, 40(3), pp.333–6
- Yalow, R. & Berson, S., 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods, *Nature*, pp.1648-1648
- Yoo, A., Harris, J. & Dubrovsky, B., 1996. Dose-response study of dehydroepiandrosterone sulfate on dentate gyrus long term potentiation. *Experimental Neurology*, 137(1), pp.151–156.
- Zenk, J.L., Frestedt, J.L. & Kuskowski, M.A., 2007. HUM5007, a novel combination of thermogenic compounds, and 3-acetyl-7-oxo-dehydroepiandrosterone: each increases the resting metabolic rate of overweight adults. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9), pp.629–634. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17418559> [Accessed August 8, 2016].
- Zwain, I.H. & Yen, S.S.C., 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*, 140(8), pp.3843–3852.

## 9. PŘÍLOHA A

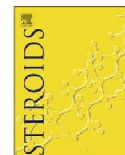
Steroids 98 (2015) 1–8



Contents lists available at ScienceDirect

Steroids

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/steroids](http://www.elsevier.com/locate/steroids)



### Determination of seven selected neuro- and immunomodulatory steroids in human cerebrospinal fluid and plasma using LC-MS/MS

Lucie Sosvorova<sup>a</sup>, Jana Vitku<sup>a</sup>, Tereza Chlupacova<sup>a</sup>, Milan Mohapl<sup>b</sup>, Richard Hampl<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Endocrinology, Department of Steroids and Proteofactors, Narodni 8, 11694 Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Military University Hospital Prague, Department of Neurosurgery, U Vojenske nemocnice 1200, 16902 Prague, Czech Republic

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 11 August 2014

Received in revised form 31 December 2014

Accepted 23 January 2015

Available online 9 February 2015

##### Keywords:

LC-MS/MS

Dehydroepiandrosterone metabolites

11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase

Cerebrospinal fluid

#### ABSTRACT

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its 7-oxo- and 7-hydroxy-metabolites occurring in the brain are considered neurosteroids. Metabolism of the latter is catalysed by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) which also interconverts cortisol and cortisone. The concurrent metabolic reaction to DHEA 7-hydroxylation is the formation of 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEA. The LC-MS/MS method using triple stage quadrupole-mass spectrometer was developed for simultaneous quantification of free DHEA, 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA, 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA, 7-oxo-DHEA, 16 $\alpha$ -hydroxy-DHEA, cortisol and cortisone in human plasma and cerebrospinal fluid (CSF). The method employs 500  $\mu$ L of human plasma and 3000  $\mu$ L of CSF extracted with diethyl ether and derivatized with 2-hydrazinopyridine. It has been validated in terms of sensitivity, precision and recovery. In plasma, the following values were obtained: limit of detection: 2–50 pg/mL; limit of quantification: 5–140 pg/mL; within-day precision: 0.58–14.58%; between-day precision: 1.24–13.89% and recovery: 85–113.2%. For CSF, the values of limit of detection: 2–28 pg/mL; limit of quantification: 6–94 pg/mL; within-day precision: 0.63–5.48%; between-day precision: 0.88–14.59% and recovery: 85.1–109.4% were acquired. Medians and concentration ranges of detected steroids in plasma and CSF are given in subjects with excluded normal pressure hydrocephalus ( $n=37$ ; 65–80 years). The method enables simultaneous quantification of steroids important for the estimation of 11 $\beta$ -HSD activity in human plasma and CSF. It will be helpful in better understanding various degenerative diseases development and progression.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an important endogenous steroid with a broad range of biological effects. It is synthesized in the adrenal cortex, gonads, brain and gastrointestinal tract and is a precursor of androgens and estrogens. DHEA is, together with its sulfated derivative, the most abundant circulating steroid in young adult humans. The levels of DHEA decline considerably with age and correlate with degenerative changes [1,2]. Significant portion of circulating DHEA is further metabolized to its 7-oxygenated

derivatives – 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA and 7-oxo-DHEA in various tissues, including the liver and brain [3–5].

7 $\alpha$ -OH-DHEA was first isolated and identified in 1959 by Okada [6] and soon thereafter by Stárka [7]. For a long time, 7-hydroxylated metabolites were considered physiologically inoperative. At the turn of the millennium, however, a number of publications appeared reporting antigluco-corticoid, immunomodulatory, neuroprotective, antioxidant and antiapoptotic effects of 7-hydroxylated DHEA metabolites [1,8–13].

7-oxo-DHEA was isolated from body fluid as early as 1954 [14] and later was established as a natural constituent of human plasma and urine [1]. In the 1990s it was reported that endogenous 7-oxo-metabolite of DHEA could act as an ergosteroid, enhancing the activity of several enzymes that influence a thermogenic system in rat liver [15,16]. Later also the neuroprotective and antigluco-corticoid actions of 7-oxo-DHEA were discovered [1,17,18].

The abovementioned 7-oxygenated steroids are metabolized by the enzyme 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ -HSD1): 7 $\alpha$ -OH-DHEA is a substrate for the 11 $\beta$ -HSD1, which

**Abbreviations:** DHEA, dehydroepiandrosterone; 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone; 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone; 16 $\alpha$ -OH-DHEA, 16 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone; LC-MS/MS, liquid chromatography–tandem mass spectrometry; 11 $\beta$ -HSD, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase; CSF, cerebrospinal fluid; UPLC, ultra-high pressure liquid chromatography; MRM, multiple reaction monitoring.

\* Corresponding author.

E-mail address: [rhamp1@endo.cz](mailto:rhamp1@endo.cz) (R. Hampl).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2015.01.019>  
0039-128X/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

converts 7 $\alpha$ -OH-DHEA into 7 $\beta$ -OH-DHEA via 7-oxo-DHEA and also vice versa [19–21]. The 11 $\beta$ -HSD1 is mainly localized in glucocorticoid responsive tissues such as liver, brain, adipose tissue and others, where the NADP(H)-dependent oxido-reduction of cortisol to cortisone occurs, [19,21,22]. The modelling analyses indicated that 7-oxo and 7-OH-DHEA occupy the same binding site in 11 $\beta$ -HSD1 as cortisol and cortisone, respectively [23].

A concurrent metabolic reaction to 7-hydroxylation of DHEA is hydroxylation at carbon 16, resulting in 16-hydroxylated steroids [1]. 16 $\alpha$ -OH-DHEA was first detected in humans in the 1950s [24], and only several reports concerning this steroid appeared later [25–29]. 16 $\alpha$ -Hydroxylation of DHEA occurs in liver, adrenal cortex and also in several other tissues [30]. Increased levels of 16 $\alpha$ -OH-DHEA were recently associated with autoimmune diseases and may counteract the beneficial effects of 7-oxo- and 7-hydroxylated-DHEA metabolites. The ratio of 16 $\alpha$ -OH-, 7 $\alpha$ -OH-, 7 $\beta$ -OH- and 7-oxo-DHEA in blood and various tissues may differ in healthy subjects and patients with autoimmune diseases and brain function disorders [29]. Recently, 16 $\alpha$ -OH-DHEA was also detected in the cerebrospinal fluid (CSF) [31]. It indirectly supports the previous hypothesis of the role of 16 $\alpha$ -OH-DHEA in brain function disorders.

This work presents the development and validation of a sensitive method, which involves liquid–liquid extraction, derivatization with 2-hydrazinopyridine and LC–MS/MS, for simultaneous quantification of DHEA, 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA, 16 $\alpha$ -OH-DHEA, cortisol and cortisone in human plasma and CSF.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and reagents

Cortisol, cortisone and dehydroepiandrosterone (DHEA) were purchased from Koch–Light Laboratories LTD (Colnbrook, Great Britain), 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA, 16 $\alpha$ -OH-DHEA and D3-DHEA were from Steraloids (Newport, USA). D4-Cortisol was from CDN isotopes (Ponte-Claire, Canada). 2-hydrazinopyridine, ammonium formate, methyl tert-butyl ether and trifluoroacetic acid were from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). LC–MS grade methanol, water and diethyl ether were from Merck AG (Darmstadt, Germany). The physiological solution (0.9% sodium chloride) was from B-Braun (Melsungen AG, Germany). [1,2,6,7- $^3$ H]Cortisol, specific radioactivity 3.04 TBq/mmol was from Amersham Biosciences, Inc. (Amersham, UK).

### 2.2. Preparation of stock solutions, calibration standards, and quality control samples

Stock solutions of steroids and deuterated steroids were prepared gravimetrically in methanol at the concentration of 1 mg/mL. Working standard solutions were prepared at 10 ng/mL and 1 ng/mL by diluting the stock solutions with methanol. The LC/MS standard solution was prepared by mixing appropriate volumes of individual steroid working solution and methanol to obtain a mixture containing 400 ng/mL cortisol, 80 ng/mL cortisone, 20 ng/mL DHEA, 3 ng/mL 7 $\alpha$ -OH-DHEA and 7 $\beta$ -OH-DHEA, 1 ng/mL 7-oxo-DHEA and 16 $\alpha$ -OH-DHEA for plasma samples. For the CSF samples, the LC/MS standard solution contained 100 ng/mL cortisol, 25 ng/mL cortisone, 2 ng/mL 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 1 ng/mL DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA and 16 $\alpha$ -OH-DHEA. All stock standards and LC/MS standards were stored at  $-20^\circ\text{C}$  and allowed to equilibrate at room temperature for at least 15 min before use. An eight-points calibration curve was prepared for calibration.

The stock internal standard solutions contained D3-DHEA and D4-cortisol (plasma: 10 ng/mL and 100 ng/mL, respectively; CSF: both 10 ng/mL). All standard and internal standard solutions were first pipetted into an empty tube and evaporated in a vacuum evaporator to dryness.

The calibration curve samples, zero samples (only internal standards added) and blank samples (no standards added) were prepared in duplicate similarly for the plasma and CSF samples, only by substituting plasma with charcoal-treated plasma and CSF with physiological solution. Calibration ranges for individual steroids are shown in Table 1. Quality control samples were prepared in-house, using a pool plasma and CSF with appropriate volumes of steroid stock solutions. Charcoal treated plasma was prepared by an in-house method employing multistep adsorption of steroids on charcoal. Absence of steroids was checked by spiking of plasma with [ $^3$ H]cortisol (10,000 dpm/mL) and measurement of remaining radioactivity close to zero.

### 2.3. Samples

Samples were previously collected from 37 subjects (64–85 years; 24 females and 13 males) tested for suspected normal pressure hydrocephalus, in which, however, this diagnosis was excluded on the basis of a combination of NMR imaging and lumbar drainage test [32]. Peripheral blood and CSF were collected in the morning before lumbar drainage test. The surgeries were

**Table 1**

The calibration ranges, correlation coefficients, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ), within-day and between-day coefficients of variability (CV) for individual steroids in plasma and cerebrospinal fluid.

Analyte	Calibration range (ng/mL)	Correlation coefficient ( $R^2$ )	LOD (pg/mL)	LOQ (pg/mL)	Within-day CV (%)	Between-day CV (%)
<i>Plasma matrix</i>						
DHEA	0.156–20	0.9995	5	15	0.58–6.31	3.46–4.24
Cortisol	3.125–400	0.9998	50	140	0.55–3.92	4.19–9.31
Cortisone	0.625–80	0.999	4	13	1.67–6.00	1.32–8.07
7 $\alpha$ -OH-DHEA	0.023–3	0.9991	3	10	3.78–9.48	5.8–10.1
7 $\beta$ -OH-DHEA	0.023–3	0.9992	2	5	4.79–13.05	5.20–10.46
7-oxo-DHEA	0.008–1	0.9988	3	8	2.26–9.52	5.02–8.41
16 $\alpha$ -OH-DHEA	0.008–1	0.9989	2	5	10.09–14.85	1.24–13.89
<i>Cerebrospinal fluid matrix</i>						
DHEA	0.008–1	0.9996	4	12	3.31–4.75	0.88–4.47
Cortisol	0.8–100	0.9994	28	94	0.81–2.38	3.09–5.05
Cortisone	0.2–25	0.999	9	30	0.85–4.44	4.74–9.5
7 $\alpha$ -OH-DHEA	0.016–2	0.9993	12	40	2.32–4.32	1.85–4.50
7 $\beta$ -OH-DHEA	0.008–1	0.9994	2	6	2.09–2.42	2.75–6.48
7-oxo-DHEA	0.008–1	0.9989	12	40	4.28–5.48	4.45–14.59
16 $\alpha$ -OH-DHEA	0.008–1	0.9989	5	16	0.63–3.42	1.82–7.99



performed in Department of Neurosurgery of Central Military Hospital in Prague.

Samples for the preparation of pooled plasma, charcoal-treated plasma and pooled CSF were the excessive amounts obtained from subjects investigated for the scientific purposes in the Institute of Endocrinology and Department of Neurosurgery of Central Military Hospital in Prague.

Samples were collected in plastic tubes, frozen and stored at  $-79^{\circ}\text{C}$ . The protocol was approved by the Ethical Committee of the Institute of Endocrinology. Informed and written consent with the use of biological materials for research reasons was obtained from all subjects participating to the project.

#### 2.4. Optimization of extraction procedure, derivatization reaction and LC–MS/MS analysis

Methyl tert-butyl ether and diethyl ether in various volumes and extraction times were tested for the extraction. The diethyl ether extraction showed higher signals and better shapes of individual peaks. Various reaction volumes (50, 100 and 200  $\mu\text{L}$ ) and reaction times (10, 15, 20, 30, 45 and 60 min) were tested to obtain monoderivates with 2-hydrazinopyridine giving the highest intensities of the signal.

For the liquid chromatography, various mobile phases with and without formic acid (0.1%), mobile phase gradients, flow rates and column oven temperatures were used. For selected conditions, the best intensities and shapes of individual peaks were reached.

Optimal conditions were used for sample preparation and LC–MS/MS analysis.

#### 2.5. Sample preparation

Plasma sample (500  $\mu\text{L}$ ) was spiked with 10  $\mu\text{L}$  of stock internal standard solution and diluted with 500  $\mu\text{L}$  of the physiological solution. Samples were extracted with 3 mL of diethyl ether to obtain free (unconjugated) steroids; the water phase was frozen in solid carbon dioxide and the organic phase was transferred into a glass tube and the solvent was evaporated. Control samples of the known concentration of individual analytes were processed in the same way.

CSF sample (3000  $\mu\text{L}$ ) was spiked with 20  $\mu\text{L}$  of stock internal standard solution, diluted with 1000  $\mu\text{L}$  of physiological solution and then extracted with 4 mL of diethyl ether, the water phase was frozen in solid carbon dioxide and the organic phase was transferred into a glass tube. The organic phase was evaporated. Control samples of the known concentration of individual analytes were processed in the same way.

In the next step 100  $\mu\text{L}$  of derivatization solution was added. This solution was prepared freshly and contained 2-hydrazinopyridine, methanol and trifluoroacetic acid (1 mg; 5 mL; 1.63  $\mu\text{L}$ ) according to Higashi et al. [33]. The samples were mixed and incubated for 15 min at  $60^{\circ}\text{C}$ . After incubation, the solvent was evaporated under stream of nitrogen.

The dry residues were dissolved in 100  $\mu\text{L}$  of 10 mM ammonium formate solution in 50% methanol and mixed vigorously to rinse the tube walls. The samples were then centrifuged (2000g, 4 min,  $22^{\circ}\text{C}$ ). The whole amount of the solution was transferred to the insert vials and 50  $\mu\text{L}$ , corresponding to 250  $\mu\text{L}$  of plasma and 1500  $\mu\text{L}$  of CSF, respectively, were injected into the UPLC.

#### 2.6. LC–MS/MS conditions

LC–MS/MS was performed using an API 3200 (AB Sciex, Concord, Canada) triple stage quadrupole-mass spectrometer with

electrospray ionization (ESI) connected to the UPLC Eksigent ultra-LC 110 system (Redwood City, CA, USA). Chromatographic separation was carried out on Kinetex C18 2.6  $\mu\text{m}$  (150  $\times$  3.0 mm) column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) with a corresponding security guard at the flow rate 0.55 mL/min at  $40^{\circ}\text{C}$  for plasma samples and at the flow rate 0.75 mL/min at  $50^{\circ}\text{C}$  for CSF samples.

Mobile phases consisted of water (solvent A) and methanol (solvent B). The following gradient was employed (all steps linear): 0 min, 50:50 (A:B); 2 min, 50:50; 6 min, 10:90; 7 min, 5:95; 8 min 50 s, 5:95; 9 min, 50:50; 11 min, 50:50 and at 11 min stop for plasma samples and 0 min, 50:50 (A:B); 2 min, 50:50; 4 min, 25:75; 7 min, 5:95; 8.5 min 5:95; 9 min, 50:50; 10 min, 50:50 and at 10 min stop for CSF samples. LC mobile phase was diverted to waste till the 3rd minute and from the 9th minute of the run.

The mass spectrometer was operating in the positive ESI mode using multiple-reaction monitoring transitions (MRMs). The conditions were as follows: curtain gas: 25 psi, ion spray voltage: 5.5 kV, vaporizer temperature:  $600^{\circ}\text{C}$ , ion source gas 1: 40 psi, ion source gas 2: 60 psi, interface heater: on. Nitrogen was produced by a high purity nitrogen generator (Peak Scientific instruments Ltd., model NM20Z, Renfrewshire, Scotland) and employed as curtain, nebulizer and collision gasses.

#### 2.7. Quantification of the samples

The analytes were quantified by means of calibration curves made on the basis of known concentrations in the mixtures of analysed standards with constant level of internal standards. The calibration curves were obtained by plotting the response factor (– analyte area/internal standard area) against the concentration of the calibration standard. The values were corrected for procedural losses according to yields of internal standards. For DHEA, 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA and 16 $\alpha$ -OH-DHEA D3-DHEA was used as internal standard. Cortisol and cortisone were quantified using the D4-cortisol as internal standard.

#### 2.8. Method performance characteristics

Calibration curves were obtained by linear regression analysis using internal standardization. The data were fit to a linear least square regression curve with a weighing index of  $1/x$ . Calibration ranges and correlation coefficients for individual steroids are shown in Table 1. Peak area ratio between target analyte and its internal standard was used for quantitation. The assay acceptance criterion for each back-calculated standard concentration was 15% deviation from the nominal value.

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were defined according to Taverniers [34] as the concentrations at which the signal-to-noise ratio (S/N) was 3 and 10, respectively. They were determined by repetitive analyses ( $n = 6$ ) of the lowest quality control samples independent of the calibration curve, which were stepwise diluted so that the S/N was around 10 and 3. The analyte response was compared to the zero sample response.

For the precision study, the concentrations of each analyte was determined six times during the same day (within-day precision) and six times on different days (between-day precision). The precision was expressed as relative standard deviation (RSD).

For the plasma samples, the recovery of the analytes was determined by spiking pooled plasma ( $n = 5$ ) with three concentrations according to the physiological value of individual analytes. The method employing CSF, the recovery of the analytes was determined by spiking pooled CSF samples with two concentrations

**Table 2**

Mass spectrometric settings: precursor, quantification and confirmation ions, declustering potentials (DP), entrance potentials (EP), collision entrance potentials (CEP), collision energies (CE) and collision cell exit potentials (CXP) for measured analytes and deuterated internal standards and retention times (RT) of detected steroids in plasma and CSF.

Analyte	Precursor ion	Quantification ion	Confirmation ion	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V) <sup>a</sup>	CXP (V) <sup>a</sup>	Plasma RT (min)	CSF RT (min)
DHEA	380	159	131	66	5	20	43 (53)	4	7.42	6.14
Cortisol	454	120	121	81	8.5	20	73 (53)	4	6.53	5.16
Cortisone	452	121	120	71	6.5	22	51 (51)	4	6.33	5.02
7 $\alpha$ -OH-DHEA	369	134	115	66	11	20	45 (129)	4	6.42	5.07
7 $\beta$ -OH-DHEA	396	148	131	76	8	22	41 (45)	4	6.03	4.78
7-oxo-DHEA	394	131	107	71	8	18	51 (59)	4	6.11	4.86
16 $\alpha$ -OH-DHEA	396	378	128	56	7.5	20	29 (29)	32 (4)	6.58	5.31
D4-Cortisol	458	120	121	91	7	22	71 (55)	4	6.54	5.19
D3-DHEA	383	162	107	66	9.5	16	43 (47)	4	7.43	6.12

<sup>a</sup> Values for the confirmation ion are given in the parentheses.

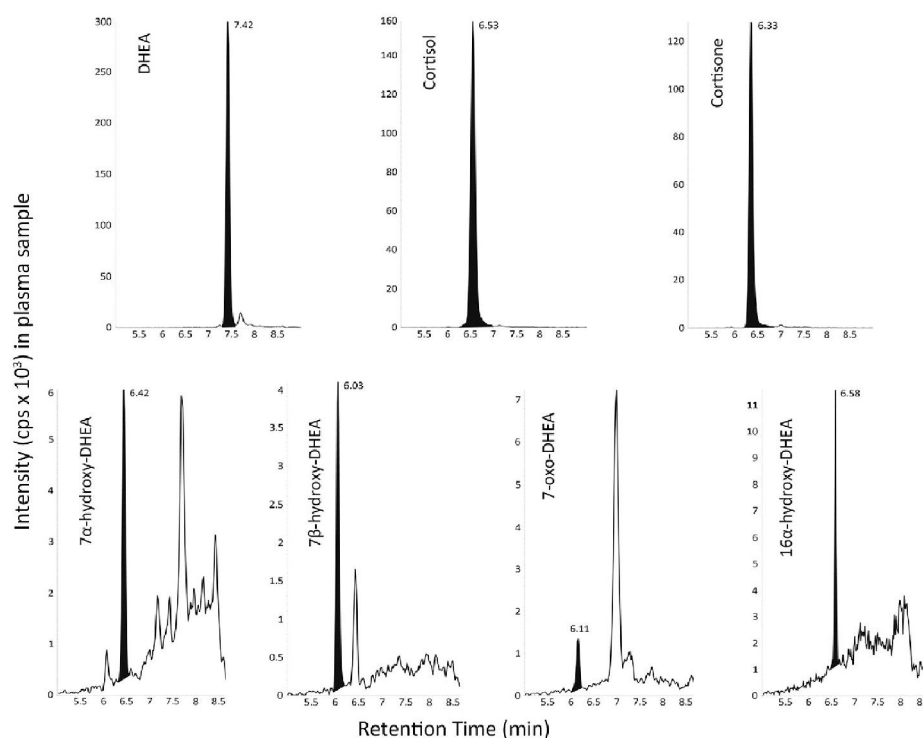


Fig. 1. Chromatograms of individual steroids in plasma sample. Transition details are presented in Table 2 and retention times (min) are indicated above the peak.

according to the physiological values of individual analytes. The spiking by only two concentrations was proceeded because of the limited amount of CSF matrix. The spiked samples were processed in the same way as real samples. The recoveries for individual analytes were calculated as [(concentration of the analyte in spiked sample – concentration in non-spiked sample)/amounts of added steroids] \* 100 (%).

Matrix effect, which is the result of the ion suppression was determined according to Annesley [35] by performing post-column infusion. Visual inspection of the post-column perfusion transitions revealed no evidence of any significant drop in MS/MS signal

during the retention times of measured steroids and deuterated steroids.

Carry-over was determined by running a blank solvent after the highest calibrator and by injecting a control sample of known concentration of analytes.

## 2.9. Data and statistical analysis

Analyst software version 1.6 (AB Sciex, Concord, Canada) was employed for data acquisition, peak-area integration and quantitation of unknown plasma and CSF samples. Calibration curves were

derived in each analytical run. Validation data were calculated using Microsoft Excel® 2013.

### 3. Results

#### 3.1. Method performance characteristics

The precursor, quantification and confirmation ions of individual steroids and other optimized values as well as the retention times are summarized in Table 2. The representative chromatograms of individual steroids in plasma and cerebrospinal fluid sample are shown in Figs. 1 and 2.

The linearity of the method expressed by the correlation coefficients is summarized in Table 1. The correlation coefficients were 0.9988 and higher. The LODs and LOQs of individual analytes are summarized in Table 1. The within-day and between-day coefficients of variation (CV) are demonstrated in Table 1. The RSD was in all steroids lower than 15%. The recoveries in plasma and CSF samples are summarized in Table 3. The recoveries were in the range of 85–113.2% and 85.1–112.6% in plasma and CSF, respectively. In both matrices, no carry-over was detected.

#### 3.2. Application to plasma and CSF samples

Medians and concentration ranges of individual free steroid hormones in plasma and CSF in abovementioned subjects are

summarized in Table 4. There were observed no significant differences between men and women except plasma 7 $\alpha$ -OH-DHEA; see e.g. [1].

### 4. Discussion

Derivatization by 2-hydrazinopyridine has been described for several steroids including DHEA, cortisol and cortisone [33,36], but so far not for 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA and 16 $\alpha$ -OH-DHEA. These steroids are usually determined by radioimmunoassays [37–40] and by gas-chromatography–mass spectrometry [17,31,41–43]. The HPLC/MS determination for these 7-oxygenated steroids was published only for identification purposes [19,44–46].

Our LC–MS/MS method enables rapid, complex and more sensitive and precise determination of 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA and 16 $\alpha$ -OH-DHEA, when compared to the immuno-analytical methods. Together with the determination of DHEA, cortisol and cortisone it may serve for the complex evaluation of the 11 $\beta$ -HSD1 activity. Considering the detection limits of each of determined steroid, using of 500  $\mu$ L of plasma and 3000  $\mu$ L of CSF provide satisfactory accuracy, precision and recovery.

Derivatization of analytes is effective to improve the sensitivity on LC–MS/MS and increase the detection response. Thanks to derivatization it is possible to measure abovementioned analytes in the pg/mL order of magnitude with triple stage quadrupole mass

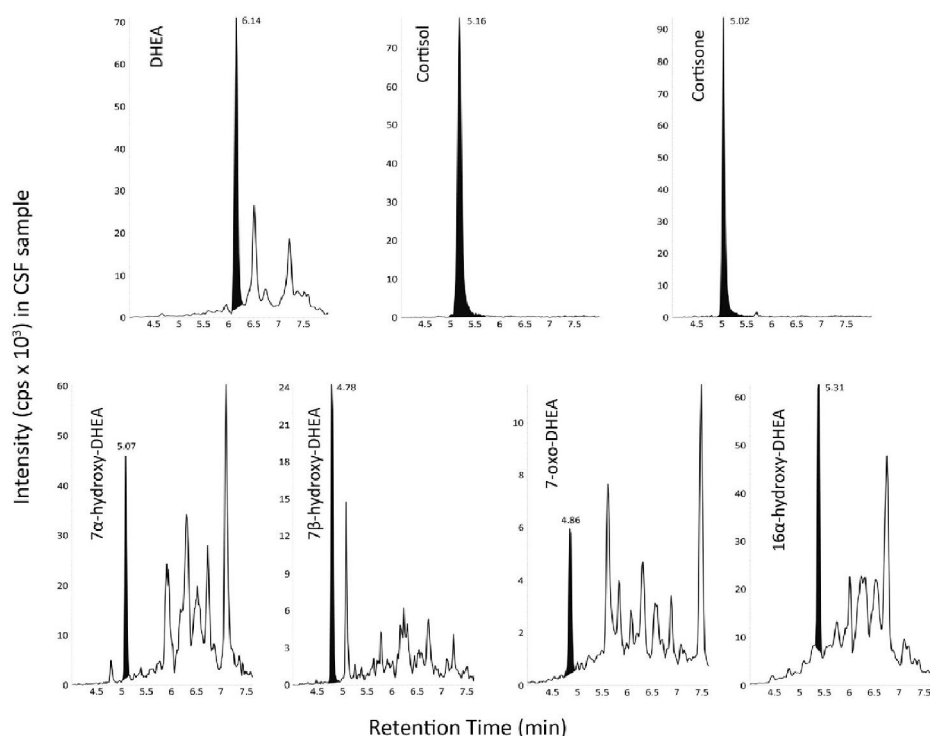


Fig. 2. Chromatograms of individual steroids in cerebrospinal fluid (CSF) sample. Transition details are presented in Table 2 and retention times (min) are indicated above the peak.



**Table 3**  
Recovery from addition at three concentration levels in plasma.

Analyte	Amount added to plasma matrix (ng/mL)	Recovery in plasma (%)	Amount added to CSF matrix (ng/mL)	Recovery in CSF (%)
Cortisol	8	95.8	2.67	103.6
	40	92.5	10.67	96.1
	120	91.0		
Cortisone	1.6	95.8	0.67	87.1
	8	106.5	2.67	78.4
	24	110.1		
DHEA	1.6	109.7	0.027	99.4
	8	98.1	0.155	100.2
	24	93.3		
7 $\alpha$ -OH-DHEA	0.06	101.1	0.053	108.6
	0.3	109.7	0.213	109.4
	1.5	88.4		
7 $\beta$ -OH-DHEA	0.06	106.1	0.027	96.5
	0.3	111.6	0.155	93.8
	1.5	85.0		
7-oxo-DHEA	0.02	104.0	0.027	89.5
	0.1	98.3	0.155	85.1
	0.5	94.2		
16 $\alpha$ -OH-DHEA	0.02	102.5	0.027	112.6
	0.1	107.8	0.155	109.5
	0.5	113.2		

Replicate:  $n = 5$  and at two concentration levels in cerebrospinal fluid (CSF), replicate:  $n = 5$ .

**Table 4**  
Medians and concentration ranges of free steroids in plasma and cerebrospinal fluid samples. LOD means limit of detection. The concentration of steroids are provided in ng/mL.

Analyte	Plasma		Cerebrospinal fluid	
	Concentration range	Medians	Concentration range	Medians
DHEA	0.066–2.190	0.83	0.004–0.610	0.03
Cortisol	23.8–184.0	96.75	0.808–20.20	6.54
Cortisone	7.161–26.601	18.85	0.137–5.028	2.0
Cortisol/cortisone	2.72–9.02	5.06	1.15–10.31	2.91
7 $\alpha$ -OH-DHEA	0.058–0.380	0.138	0.016–0.315	0.06
7 $\beta$ -OH-DHEA	0.024–0.072	0.049	0.003–0.041	0.01
7-oxo-DHEA	0.009–0.052	0.017	Under LOD	Under LOD
16 $\alpha$ -OH-DHEA	0.027–0.068	0.051	0.005–0.027	0.006

detector. Without derivatization, more sophisticated LC–MS/MS instruments would be necessary which are not easily accessible for many research and healthcare laboratories. 500  $\mu$ L of plasma is routinely used amount for the majority of medical devices. 3000  $\mu$ L of CSF is a large volume, but when investigating the neurological diseases, CSF is easily accessible by performing the lumbar puncture or lumbar drainage, which is routinely carried out in the neurosurgical departments.

The analysis of CSF has become a suitable method in the diagnosis and understanding of various neurodegenerative disorders. CSF is in the close contact with the brain extracellular fluid and therefore can better reflect biological processes in the brain. Transport of the analytes from blood to CSF may be disturbed by several disorders and therefore might be CSF an excellent material in disease diagnosis [47].

To the best of our knowledge, this is the first attempt to determine free 7-oxo-DHEA in CSF at all, however the levels of this

metabolite in CSF were at the edge or under the detection limit of our method (below 12 pg/mL). These results supported the hypothesis, that 7-oxo-DHEA is only an intermediate involving 7 $\alpha$ -OH-DHEA and 7 $\beta$ -OH-DHEA interconversion [19]. The 11 $\beta$ -HSD1 activity in CSF is shifted toward hydroxylated metabolites of DHEA. This is also the first LC–MS/MS determination of free 7 $\alpha$ -OH-DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA, 7-oxo-DHEA, 16 $\alpha$ -OH-DHEA in their 2-hydrazinopyridinated form.

When comparing our results in plasma and CSF samples with the results of other authors, our data from LC–MS/MS analysis are in a good agreement, especially for 7 $\alpha$ -OH-DHEA, being very close to the data of Kancheva et al. [31,48] and Kim et al. [49], however these results show lower values than corresponding data from immunoassays [38]. It is also valid for DHEA, 7 $\beta$ -OH-DHEA and plasma 7-oxo-DHEA [38,39]. The lower levels obtained by instrumental methods can be explained in general by cross-reactivities and lower specificities of immunoanalytical methods. The levels of plasma 16 $\alpha$ -OH-DHEA corresponded with both instrumental and immunoanalytical methods [31,48,50]. Its CSF levels were about three times higher when compared data from third ventricle measured by GC–MS using the single quadrupole mass spectrometer [31,48]. Concerning cortisol and cortisone in plasma and CSF, the levels were in a good agreement with one of the most recent results of Sinclair et al. [51] and McWhinney et al. [52].

The determination of the above-mentioned free steroids in plasma and CSF may help to understand the origin of these steroids, i.e. whether they are of peripheral origin or synthesized de novo in the CNS. In general, our data are in agreement with the concept that a part of steroids may be synthesized de novo in CNS from the steroid precursors or directly transported from the periphery. The CNS synthesis and transport from the periphery might be complementary in some cases, i.e. brain synthesis might provide minimum level of steroids, which are indispensable for the CNS functions [31].

Our and other author's results [31] indicate relatively close concentrations of free 7 $\alpha$ -OH-DHEA in CSF and plasma. These results demonstrated relatively uncomplicated transport of this steroid between CSF and peripheral circulation and supported the concept that 7 $\alpha$ -OH-DHEA may originate in the brain and also penetrate from the periphery in the CNS. 7 $\alpha$ -OH-DHEA is in CNS further converted to 7 $\beta$ -OH-DHEA via 7-oxo-DHEA in the CNS. Among free 7 $\alpha$ -OH-DHEA, we found substantially lower levels of the CNS steroids in comparison with the levels in circulation. Free cortisol and cortisone levels in CSF were lower than in plasma, which is in accordance with other author's results [51]. 11 $\beta$ HSD1 is expressed in humans in many brain areas [53] suggesting that 11 $\beta$ HSD1 could be an important regulator of the local (*in situ*) concentration of biologically active hormone. With respect to its counterregulatory potential to 7-oxygenated steroids, the determination of free 16 $\alpha$ -OH-DHEA in CSF may serve as additional marker of brain disorders of autoimmune origin. As with the majority of determined steroids, the levels of free 16 $\alpha$ -OH-DHEA were also lower in CSF compared to the levels in plasma.

## 5. Conclusion

The standardized sample preparation procedure, detection limits, analysis time and the multi-analyte estimation make this LC–MS/MS method suitable for the determination of free DHEA and its 16 $\alpha$ -OH-, 7 $\alpha$ -OH-, 7 $\beta$ -OH- and 7-oxo-metabolites. This combination of these analytes together with free cortisol and cortisone enables the estimation of 11 $\beta$ -HSD1 activity in plasma and CSF. The simultaneous determination of the abovementioned free steroids in plasma and CSF may be helpful for better understanding of the development and progression of various neurodegenerative

diseases including Alzheimer's dementia and normal pressure hydrocephalus.

### Acknowledgement

This work was supported by Grants IGA NT12349-4 and NT13369-4 from the Czech Ministry of Health.

### References

- [1] Hampl R, Hill M, Stárka L. DHEA metabolites during the life span. In: Morfin R, editor. DHEA and the brain. London and New York: Taylor & Francis; 2003.
- [2] El Kihel L. Oxidative metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) and biologically active oxygenated metabolites of DHEA and epiandrosterone (EpiA)-recent reports. *Steroids* 2012;77:10–26.
- [3] Doostzadeh J, Cotillon A-C, Benalychéf A, Morfin R. Inhibition studies of dehydroepiandrosterone 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -hydroxylation in mouse liver microsomes. *Steroids* 1998;63:608–14.
- [4] Doostzadeh J, Morfin R. Studies of the enzyme complex responsible for pregnenolone and dehydroepiandrosterone 7 $\alpha$ -hydroxylation in mouse tissues. *Steroids* 1996;61:613–20.
- [5] Akwa Y, Morfin RF, Robel P, Baulieu EE. Neurosteroid metabolism. 7  $\alpha$ -hydroxylation of dehydroepiandrosterone and pregnenolone by rat brain microsomes. *Biochem J* 1992;288(Pt 3):959–64.
- [6] Okada M, Fukushima DK, Gallagher TF. Isolation and characterization of 3  $\beta$ -hydroxy- $\Delta$ 5-steroids in adrenal carcinoma. *J Biol Chem* 1959;234:1688–92.
- [7] Stárka L. 7 $\alpha$ -Hydroxylierung von dehydroepiandrosteron in menschlicher Nebennierenrinde und Leber. *Naturwissenschaften* 1965;52:499.
- [8] Morfin R, Lafaye P, Cotillon AC, Nato F, Chmielewski V, Pompon D. 7 $\alpha$ -Hydroxy-dehydroepiandrosterone and immune response. *Annals NY Acad Sci* 2000;917:971–82.
- [9] Hampl R, Hill M, Šterzl I, Stárka L. Immunomodulatory 7-hydroxylated metabolites of dehydroepiandrosterone are present in human semen. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;75:273–6.
- [10] Pellissier MA, Trap C, Malewiak MI, Morfin R. Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver. *Steroids* 2004;69:137–44.
- [11] Akwa Y, Young J, Kabbadj K, Sancho MJ, Zucman D, Vourc'h C, et al. Neurosteroids: biosynthesis, metabolism and function of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40:71–81.
- [12] Jellinck PH, Croft G, McEwen BS, Gottfried-Blackmore A, Jones G, Byford V, et al. Metabolism of dehydroepiandrosterone by rodent brain cell lines: relationship between 7-hydroxylation and aromatization. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;93:81–6.
- [13] Morfin R, Courchay G. Pregnenolone and dehydroepiandrosterone as precursors of native 7-hydroxylated metabolites which increase the immune response in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;50:91–100.
- [14] Fukushima DK, Kemp AD, Schneider R, Stokem MB, Gallagher TF. Studies in steroid metabolism. XXV. Isolation and characterization of new urinary steroids. *J Biol Chem* 1954;210:129–37.
- [15] Lardy H, Partridge B, Kneer N, Wei Y. Ergosteroids: induction of thermogenic enzymes in liver of rats treated with steroids derived from dehydroepiandrosterone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6617–9.
- [16] Bobyleva V, Bellei M, Kneer N, Lardy H. The effects of the ergosteroid 7-oxo-dehydroepiandrosterone on mitochondrial membrane potential: possible relationship to thermogenesis. *Arch Biochem Biophys* 1997;341:122–8.
- [17] Hill M, Havlikova H, Vrblikova J, Kancheva R, Kancheva I, Pouzar V, et al. The identification and simultaneous quantification of 7-hydroxylated metabolites of pregnenolone, dehydroepiandrosterone, 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -androstenediol, and testosterone in human serum using gas chromatography–mass spectrometry. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;96:187–200.
- [18] Gottfried-Blackmore A, Jellinck PH, Vecchiarelli HA, Masheeb Z, Kaufmann M, McEwen BS, et al. 7 $\alpha$ -hydroxylation of dehydroepiandrosterone does not interfere with the activation of glucocorticoids by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in E(t)C cerebellar neurons. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013;138:290–7.
- [19] Muller C, Pompon D, Urban P, Morfin R. Inter-conversion of 7 $\alpha$ -hydroxy- and 7 $\beta$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone by the human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;99:215–22.
- [20] Ferroud C, Reval G, Morfin R. Chemical and biochemical approaches to the production of 7-hydroxylated C19-steroids. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2012;10:293–9.
- [21] Robinson B, Michael KK, Ripp SI, Winters SJ, Prough RA. Glucocorticoids inhibit interconversion of 7-hydroxy and 7-oxo metabolites of dehydroepiandrosterone: a role for 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases? *Arch Biochem Biophys* 2003;412:251–8.
- [22] Seckl JR, Walker BR. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a modulator of glucocorticoid action: from metabolism to memory. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:418–24.
- [23] Nashev LG, Chandsawangbhuwana C, Balazs Z, Atanasov AG, Dick B, Frey FJ, et al. Hexose-6-phosphate dehydrogenase modulates 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1-dependent metabolism of 7-keto- and 7 $\beta$ -hydroxy-neurosteroids. *PLoS One* 2007;2:e561.
- [24] Fotherby K, Colas A, Atherden SM, Marrian GF. The isolation of 16 $\alpha$ -hydroxydehydroepiandrosterone (3 $\beta$ :16 $\alpha$ -dihydroxyandrost-5-en-17-one) from the urine of normal men. *Biochem J* 1957;66:664–9.
- [25] Reynolds JW. The excretion of two  $\Delta$ 5-3- $\beta$ -OH, 16- $\alpha$ -hydroxysteroids by patients with congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* 1965;36:583–91.
- [26] Cleary RE, Pion RJ. Urinary excretion of 16  $\alpha$ -hydroxydehydroepiandrosterone and 16-ketoandrostenediol during the early neonatal period. *J Clin Endocr Metab* 1968;28:372–8.
- [27] Tagawa N, Kusuda S, Kobayashi Y. C16 hydroxylation of 3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta$ 5-steroids during the early neonatal period. *Biol Pharm Bull* 1997;20:1295–9.
- [28] Heřt J, Hill M, Hampl R. Gas chromatographic-mass spectrometric identification of 16 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone in human seminal plasma. *Steroids* 2004;69:773–7.
- [29] Pouzar V, Černý I, Hill M, Běličková M, Hampl R. Derivatives of 16 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone with an additional 7-oxo or 7-hydroxy substituent: synthesis and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Steroids* 2005;70:739–49.
- [30] Hampl R, Stárka L. Minireview: 16 $\alpha$ -hydroxylated metabolites of dehydroepiandrosterone and their biological significance. *Endocr Regul* 2000;34:161–3.
- [31] Kancheva R, Hill M, Novak Z, Chrastina J, Velikova M, Kancheva L, et al. Peripheral neuroactive steroids may be as good as the steroids in the cerebrospinal fluid for the diagnostics of CNS disturbances. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;119:35–44.
- [32] Walchenbach R, Geiger E, Thomeer RTWM, Vanneste JAL. The value of temporary external lumbar CSF drainage in predicting the outcome of shunting on normal pressure hydrocephalus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72:503–6.
- [33] Higashi T, Nishio T, Hayashi N, Shimada K. Alternative procedure for charged derivatization to enhance detection responses of steroids in electrospray ionization-MS. *Chem Pharm Bull* 2007;55:652–5.
- [34] Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC* 2004;23:535–52.
- [35] Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* 2003;49:1041–4.
- [36] Higashi T, Shibayama Y, Shimada K. Determination of salivary dehydroepiandrosterone using liquid chromatography–tandem mass spectrometry combined with charged derivatization. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2007;846:195–201.
- [37] Lapcik O, Hampl R, Hill M, Běličková M, Stárka L. Immunoassay of 7-hydroxysteroids. 1. Radioimmunoassay of 7 $\beta$ -hydroxy dehydroepiandrosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;67:439–45.
- [38] Lapcik O, Hampl R, Hill M, Stárka L. Immunoassay of 7-hydroxysteroids: 1. Radioimmunoassay of 7 $\alpha$ -hydroxy dehydroepiandrosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;71:231–7.
- [39] Kazhnikova H, Zamrazilova I, Hill M, Lapcik O, Pouzar V, Hampl R. A novel radioimmunoassay of 7-oxo-DHEA and its physiological levels. *Steroids* 2007;72:342–50.
- [40] Hampl R, Hill M, Stárka L. 7-Hydroxydehydroepiandrosterone epimers in the life span. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;78:367–72.
- [41] Hill M, Lapcik O, Havliková H, Morfin R, Hampl R. 7-Hydroxydehydroepiandrosterone epimers in human serum and saliva comparison of gas chromatography–mass spectrometry and radioimmunoassay. *J Chromatogr A* 2001;935:297–307.
- [42] Matsuzaki Y, Yoshida S, Honda A, Miyazaki T, Tanaka N, Takagiwa A, et al. Simultaneous determination of dehydroepiandrosterone and its 7-oxygenated metabolites in human serum by high-resolution gas chromatography–mass spectrometry. *Steroids* 2004;69:817–24.
- [43] Robinson B, Miller KK, Prough RA. Biosynthesis of [3H] 7  $\alpha$ -hydroxy-, 7 $\beta$ -hydroxy-, and 7-oxo-dehydroepiandrosterone using pig liver microsomal fractions. *Anal Biochem* 2004;333:128–35.
- [44] Marwah A, Gomez PE, Marwah P, Ntambi JM, Fox BG, Lardy H. Redox reactions of dehydroepiandrosterone and its metabolites in differentiating 3T3-L1 adipocytes: a liquid chromatographic-mass spectrometric study. *Arch Biochem Biophys* 2006;456:1–7.
- [45] Jellinck PH, Kaufmann M, Gottfried-Blackmore A, Croft G, Byford V, McEwen BS, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism in the brain: identification by liquid chromatography/mass spectrometry of the  $\Delta$ 4-isomer of DHEA and related steroids formed from androstenedione by mouse BV2 microglia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;98:41–7.
- [46] Chalbot S, Morfin R. Human liver S9 fractions: metabolism of dehydroepiandrosterone, epiandrosterone, and related 7-hydroxylated derivatives. *Drug Metab Dispos* 2005;33:563–9.
- [47] Stoop MP, Coulter L, Rosenling T, Shi S, Smolinska AM, Buydens L, et al. Quantitative proteomics and metabolomics analysis of normal human cerebrospinal fluid samples. *Mol Cell Proteomics* 2010;9:2063–75.
- [48] Kancheva R, Hill M, Novak Z, Chrastina J, Kancheva I, Stárka L. Neuroactive steroids in periphery and cerebrospinal fluid. *Neuroscience* 2011;191:22–7.
- [49] Kim SB. Neurosteroids: cerebrospinal fluid levels for Alzheimer's disease and vascular dementia diagnostics. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5199–206.



- [50] Zamrazilová I., Kazimirová H., Lapčík O., Hill M., Hampl R. A novel radioimmunoassay of 16 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone and its physiological levels. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;104:130–5.
- [51] Sinclair AJ, Walker EA, Burdon MA, van Beek AP, Kema IP, Hughes RA, et al. Cerebrospinal fluid corticosteroid levels and cortisol metabolism in patients with idiopathic intracranial hypertension: a link between 11 $\beta$ -HSD1 and intracranial pressure regulation? *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:5348–56.
- [52] McWhinney BC, Briscoe SE, Ungerer JP, Pretorius CJ. Measurement of cortisol, cortisone, prednisolone, dexamethasone and 11-deoxycortisol with ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application for plasma, plasma ultrafiltrate, urine and saliva in a routine laboratory. *J Chromatogr B* 2010;878:2863–9.
- [53] Bisschop PH, Dekker MJ, Osterthun W, Kwakkel J, Anink JJ, Boelen A, et al. Expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the human hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 2013;25:425–32.